

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie

**Bc. Barbora Kovandová**



**Komplement-vážíci protilátky u pacientů po transplantaci orgánů a  
jejich klinický význam**

Complement-binding antibodies in patients after organ transplantation and  
their clinical relevance

**Diplomová práce**

Vedoucí závěrečné práce:  
Doc. MUDr. Antonij Slavčev, CSc.

Praha, 2018

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, .....

.....

## Poděkování

Tímto děkuji svému školiteli doc. MUDr. Antoniji Slavčevovi, CSc. za odborné vedení při psaní této diplomové práce a za věnovaný čas. Rovněž chci poděkovat Mgr. Zuzaně Sekerkové za cenné odborné i praktické rady. V neposlední řadě děkuji Mgr. Markétě Rodové za konzultace, které mi umožnily pochopit technologické aspekty této práce. Dík náleží i mé rodině za podporu a pochopení, které mi poskytovali po celou dobu psaní této práce.

## **Abstrakt**

Diagnostika protilátkami-zprostředkované rejekce (AMR) u pacientů po transplantaci jater je velmi komplikovaná, klinické a patologické příznaky této závažné a často i život-ohrožující komplikace se mnohdy překrývají s neimunologickými symptomy, jako jsou biliární obstrukce, ischemie, trombóza a další. Navíc jsou játra proti tomuto typu rejekce do značné míry rezistentní.

Stejně jako u transplantovaných ledvin a srdcí, hlavním patologickým faktorem poškození štěpu jsou protilátky namířené proti neshodným HLA antigenům dárce orgánu (tzv. donor-specifické protilátky). Kromě analýzy HLA specificity protilátek se výzkum v poslední době zaměřuje i na zjištění, zdali jsou tyto protilátky schopné vázat komplement či nikoli. Publikací na toto téma je zatím velmi málo.

Z tohoto důvodu je cílem této diplomové práce studovat klinický význam komplement-vážících protilátek proti HLA antigenům u pacientů po transplantaci jater. Naše předběžné výsledky naznačují, že by mohla existovat souvislost mezi přítomností komplement-vážících protilátek a výskytem AMR. Tento poznatek by mohl hrát roli pro zlepšení prognózy pacientů po transplantaci jater.

## **Klíčová slova**

HLA, protilátky, C4d, komplement, transplantace jater

## **Abstract**

The diagnosis of antibody-mediated rejection after liver transplantation is complicated, due to the fact that the clinical and pathological signs of this life-threatening complication are often overlapping with non-immunological symptoms, like biliary obstruction, ischemia, thrombosis and others. Furthermore, the transplanted liver is to a great extent resistant to this type of rejection. Like in the transplanted kidney and heart, the main pathological factors of graft injury are antibodies directed to the mismatched HLA antigens of the organ donor, i.e. donor-specific antibodies. Besides analysis of HLA specificity of antibodies, research lately has been directed to define whether these antibodies are complement-binding or not. Literature data on this are however up till now limited.

Therefore, the aim of this diploma thesis was to study the clinical relevance of complement-binding antibodies against HLA antigens in patients after liver transplantation. Our preliminary results suggest that there might be a correlation between the presence of complement-binding antibodies and the development of antibody-mediated rejection. This finding may play a role for improvement of the prognosis of patients after liver transplantation.

## **Key words**

HLA, antibodies, C4d, complement, liver transplantation

# Obsah

Úvod .....	1
1. Přehled literatury .....	3
1.1. Imunologicky důležité antigeny .....	3
1.1.1. Lidské leukocytární antigeny .....	3
1.1.2. Další imunologicky důležité antigeny .....	6
1.2. Komplement .....	7
1.2.1. Klasická cesta .....	8
1.2.2. Alternativní cesta .....	8
1.2.3. Lektinová cesta .....	8
1.2.4. Vznik membrane-attack komplexu .....	8
1.2.5. Podjednotky komplementové kaskády .....	9
1.3. Rejekce .....	12
1.3.1. Akcelerovaná protilátkami-zprostředkovaná rejekce .....	12
1.3.2. Akutní celulární rejekce .....	13
1.3.3. Akutní protilátkami-zprostředkovaná rejekce .....	13
1.3.4. Chronická rejekce .....	14
1.3.5. Role komplementu v patologickém procesu rejekce .....	15
1.4. Transplantace jater .....	16
1.4.1. Historie .....	16
1.4.2. Anatomie .....	17
1.4.3. Fyziologie .....	17
1.4.4. Transplantace .....	18
1.4.5. Imunologie jater .....	19
1.4.6. Diagnostika rejekce .....	20
2. Cíle práce .....	22
3. Experimentální část .....	23
3.1. Materiál a metody .....	23
3.1.1. Soubor pacientů .....	23
3.1.2. X-map technologie .....	24
3.1.3. Porovnání C1q Screen a LIFECODES C3d Detection testu .....	25
3.2. Materiál a přístroje použité při testování .....	27
3.2.1. Materiál a chemikálie: .....	27

3.2.2. Přístroje a software: .....	28
3.3. Pracovní postup.....	29
3.3.1. Stanovení protilátek proti HLA antigenům.....	29
3.3.2. Analýza dat programem HLA Fusion .....	30
3.3.3. Stanovení C1q-vážících protilátek .....	32
3.3.4. Analýza dat v programu HLA Fusion .....	33
3.3.5. Stanovení koncentrace C3d-vážících protilátek .....	33
3.3.6. Analýza dat v programu Match It! Antibody .....	34
4. Výsledky.....	36
4.1. Demografická data .....	36
4.2. Stanovení hladiny protilátek a určení jejich specifity .....	38
4.3. Komplement-vážící protilátky .....	39
4.4. Porovnání hodnot MFI s klinickým stavem pacientů .....	42
5. Diskuse .....	44
6. Závěry .....	48
7. Seznam použité literatury.....	49
8. Přílohy .....	588

## Seznam zkratek

ABO	Systém krevních skupin
AMR	Protilátkami zprostředkovaná rejekce
APC	Antigen prezentující buňky
BCR	B-buněčný receptor
CD	Diferenciační skupina
CDC	Complement-dependent cytotoxicity, cross-match test
CMV	Cytomegalovirus
CR	Celulární rejekce
DSA	Donor specifické protilátky
EB	Epstein-Baar virus
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent assay
Fab	Antigen vázající fragment protilátek
Fc	Krystalizující fragment protilátek
HEPES	2-[4-(Hydroxyethyl)-1-piperaziny]-ethansulfononan sodný pufr
HLA	Lidský leukocytární antigen
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulin
IL	Interleukin
LFSS	Large-for-size syndrom
MAC	Membrane-attack komplex
MASP	Manózu-vážící-lektin-asociovaná serinová proteáza



MFI	Mean fluorescence intensity
MHC	Hlavní histokompatibilní komplex
MIC	Major Histocompatibility Complex Class I-related gene
NK	Natural killer buňky
NKT	Natural killer T-lymfocyty
Non-DSA	Non-donor-specifické antigeny
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Fykoerythrin
PRA	Panel reaktivní protilátky
SFSS	Small-for-size syndrom
Tc	Cytotoxické T-lymfocyty
TCR	T-buněčný receptor
Th	Pomocné T-lymfocyty
TNF	Tumor nekrotizující faktor
TRAIL	Tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand

# Úvod

Transplantace jater je jedinou možnou léčbou pro pacienty s jaterním selháním. Právě kvůli absenci jiných možností léčby a nedostatku času pro provedení některých imunologických testů (např. cross-match test) je u většiny pacientů nutné přistoupit k transplantaci i v případě několika neshod v HLA systému s dárce orgánů. To však s sebou nese riziko (kromě dalších faktorů) vývoje celulární i protilátkami-zprostředkované rejekce.

Celulární i protilátkami-zprostředkovaná rejekce jsou vážné post-transplantační komplikace, které mohou vést k nevratnému poškození a při neadekvátní léčbě i k selhání transplantovaného orgánu. Po dlouhou dobu byla věnována pozornost pouze rejekci celulární. V posledních letech se však pozornost přesouvá k protilátkami-zprostředkované rejekci (AMR) a zlepšování metod její diagnostiky.

AMR a evaluace rizika jejího vývoje jsou hlavním tématem této diplomové práce. Za účelem snížení počtu případů vzniku AMR je nutné stanovovat prediktivní markery jejího vývoje, zvláště u transplantací jater je to velmi komplikované. Souvislost vzniku AMR a výskytu protilátek proti neshodným HLA antigenům dárce u pacientů po transplantaci ledvin a srdce je známa již od začátku 21. století. Situace u jater však nebyla dlouho dostatečně prozkoumána, jelikož játra jsou proti AMR do jisté míry rezistentní díky své velké regenerační schopnosti, velkému povrchu, a specializovaným typům imunitních buněk, mimo jiné Kupfferovým buňkám schopným pohlcovat imunokomplexy, a pravděpodobně i dalším, dosud neznámým faktorům. Vystává i otázka rozdílného vlivu donor-specifických (protilátky proti neshodným HLA antigenům dárce) a non-donor-specifických protilátek na transplantovaný orgán. Některé studie již došly k závěru, že výskyt donor-specifických protilátek je rizikový faktor při vzniku AMR (Valenzuela and Reed, 2017) (O'Leary et al., 2013), je však třeba dále uvážit možnost rozdílného vlivu protilátek vážících komplement a protilátek, které komplement neváží.

Cílem této diplomové práce bylo analyzovat klinický význam komplement-vážících a komplement-nevážících protilátek proti HLA antigenům u pacientů po transplantaci jater. Komplement-vážící protilátky byly stanoveny dvěma různými soupravami, s jejichž pomocí bylo určeno, zda se jedná o donor-specifické nebo non-donor-specifické protilátky. Zjištěná data byla porovnána s klinickým stavem pacientů

(mimo jiné výsledky bioptických protokolů) a provedli jsme analýzu s cílem zjistit, zda existuje souvislost mezi výskytem komplement-vážících protilátek proti HLA antigenům a vývoje protilátkami-zprostředkované rejekce u pacientů po transplantaci jater.

# 1. Přehled literatury

## 1.1. Imunologicky důležité antigeny

### 1.1.1. Lidské leukocytární antigeny

Lidské leukocytární antigeny (Human Leukocyte Antigens, HLA) jsou glykoproteiny patřící do imunoglobulinové superrodiny. Geny, které kódují HLA antigeny, jsou součástí hlavního histokompatibilního komplexu (Major Histocompatibility Complex, MHC) a jsou u člověka lokalizovány na krátkém raménku 6. chromozomu. Zde se nachází přibližně 200 genů, přičemž 40 z nich kóduje leukocytární antigeny. Hlavní funkcí HLA, respektive MHC je prezentovat imunitnímu systému peptidy, které pocházejí z těla vlastních antigenů i antigenů cizího původu. Stojí tak na začátku kaskády reakcí, které vedou či nevedou ke vzniku imunitní odpovědi.

HLA komplex se dělí na tři oblasti (regiony): v první oblasti jsou kódovány HLA antigeny I. třídy, ve druhé oblasti HLA antigeny II. třídy a ve třetí oblasti, která není spojena s antigenní prezentací a dalšími funkcemi I. a II. regionu, jsou lokalizovány geny kódující některé proteiny komplementu, cytokiny (TNF- $\alpha$ ), heat-shock proteiny, atd. HLA antigeny I. a II. třídy hrají nezastupitelnou roli v již zmíněné prezentaci peptidů. (Klein and Sato, 2000a) (Klein and Sato, 2000b)

#### 1.1.1.1. Antigeny HLA I. třídy

Molekuly HLA I. třídy jsou tvořeny  $\alpha$  řetězcem a nekovalentně vázaným  $\beta$ 2-mikroglobulinem.  $\beta$ 2-mikroglobulin je, na rozdíl od  $\alpha$  řetězce, kódovaný na 15. chromozomu.

HLA antigeny I. třídy se dělí na tzv. klasické a neklasické. Mezi klasické patří HLA-A, B a C, mezi neklasické patří HLA-E, F a G. Klasické HLA antigeny I. třídy se nacházejí na povrchu všech jaderných buněk, míra jejich exprese však záleží na konkrétním typu buněk. Neklasické HLA antigeny I. třídy se nacházejí jen na specializovaných typech buněk a tkání, např. na trofoblastu (HLA-G), a mají

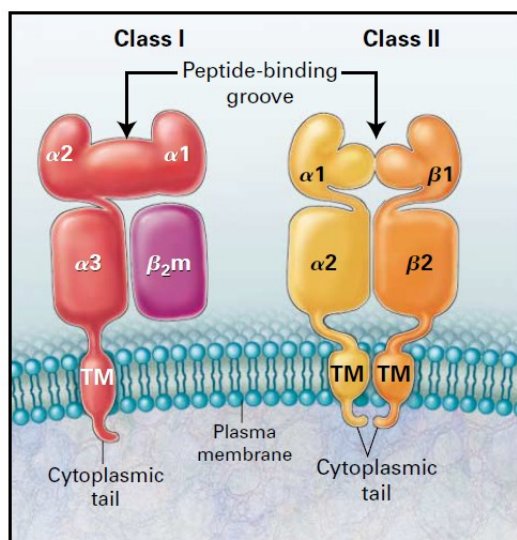
specifické funkce. Variabilita neklasických HLA antigenů I. třídy je nižší než klasických HLA antigenů I. třídy. Na rozdíl od polymorfních klasických HLA antigenů I. třídy se o neklasických HLA antigenech I. třídy hovoří jen jako o oligomorfních. (Rodgers and Cook, 2005)

HLA I. třídy jsou syntetizovány na povrchu endoplasmatického retikula, v jeho lumen pak molekuly HLA I. třídy zpravidla váží peptidy intracelulárního původu, většinou se jedná o peptidy tělu vlastní. Může se však jednat i o exogenní peptidy pocházející z intracelulárních parazitů či virů. Takový protein je označen molekulami ubiquitinu a transportován do proteasomu, kde je degradován na peptidy. Tyto peptidy jsou transportovány do lumen endoplasmatického retikula, kde se váží na molekuly HLA I. třídy. (van Kasteren et al., 2014) HLA I. třídy váží podstatně kratší peptidy, než HLA II. třídy; jejich vazebné místo je na obou koncích uzavřené a váží peptidy o délce 8 – 11 aminokyselin. (Geneugeljik et al., 2014)

#### 1.1.1.2. HLA antigeny II. třídy

Molekuly HLA antigenů II. třídy jsou heterodimery stejně jako molekuly HLA I. třídy. Tyto molekuly jsou tvořeny nekovalentně vázanými  $\alpha$  a  $\beta$  řetězci, které jsou kódovány na 6. chromozomu. Celkem jsou známy tři hlavní lokusy HLA antigenů II. třídy: HLA-DR, DQ a DP. Na rozdíl od HLA I. třídy, molekuly HLA II. třídy se nacházejí jen na antigen-prezentujících buňkách (např. dendritické buňky, makrofágy, B-lymfocyty, aktivované T-lymfocyty a thymové epiteliální buňky). (Klein and Sato, 2000a) (Klein and Sato, 2000b) V přítomnosti IFN- $\gamma$  jsou však exprese HLA antigenů II. třídy schopny i další typy buněk, např. endoteliální buňky ledviny. (Muczynski et al., 2003)

Molekuly HLA II. třídy váží peptidy extracelulárního původu. Tyto proteiny jsou fagocytovány a uvnitř endosomů degradovány pomocí proteolytických enzymů na peptidy. Následně dochází k fúzi endosomů s vezikly, které obsahují MHC II. třídy a uvnitř nich dochází k vazbě peptidů na MHC molekuly II. třídy. Tyto vezikly jsou odštěpené od endoplasmatického retikula. (van Kasteren et al., 2014) Molekuly HLA II. třídy váží delší peptidy, než molekuly HLA I. třídy – peptidy o délce 13 – 18 aminokyselin a jejich vazebné místo je otevřené. (Geneugeljik et al., 2014)



Obrázek 1 Molekuly HLA (Klein and Sato, 2000a)

#### 1.1.1.3. Mechanismus rozpoznání HLA antigenů

HLA antigeny na povrchu buněk jsou rozpoznávány T-lymfocyty pomocí T-buněčných (TCR) receptorů za pomoci koreceptorů CD4 a CD8. Konkrétně cytotoxické T-lymfocyty (T<sub>c</sub>) interagují s HLA antigeny I. třídy za pomoci CD8. Pomocné T-lymfocyty (T<sub>h</sub>) interagují s HLA antigeny II. třídy pomocí CD4. Aby však došlo k úspěšné aktivaci naivních T-lymfocytů, je za potřebí zapojení dalších kostimulačních signálů: interakce CD28 + CD80/86, respektive CD40 + CD 154 (= CD40L), bez nichž není stimulace natolik silná, aby došlo k aktivaci T-lymfocytů, dokonce může dojít i k jejich apoptóze. Zdrojem kostimulačních molekul jsou buď profesionální antigen-prezentující buňky (APC), nebo B-lymfocyty. (Ford et al., 2014) (Guermonprez et al., 2002)

Cizí HLA antigeny mohou být rozpoznány T-lymfocyty tzv. přímou nebo nepřímou cestou. Přímou cestou dochází k aktivaci T-lymfocytů pomocí APC dárce (tzv. passenger leukocytes) přítomných ve štěpu. (Geneugelijk et al., 2014)

Nepřímá cesta znamená, že jsou T-lymfocyty aktivovány kontaktem s vlastními APC. Tyto buňky prezentují endocytované a zpracované neshodné MHC antigeny dárce ve formě peptidů T-lymfocytům příjemce. K prezentaci cizích antigenů dochází zpravidla na MHC antigenech II. třídy. Následně dochází k aktivaci Th lymfocytů. Možná je však i tzv. cross-prezentace cizích HLA antigenů, při které je endocytovaný

antigen prezentován na MHC antigenech I. třídy; tímto způsobem APC aktivují i Tc lymfocyty. (DeWolf and Sykes, 2017)

Existuje pravděpodobně i další mechanismus rozpoznání antigenů prezentovaných na HLA antigenech, tzv. polopřímá cesta. V tomto případě dochází k přenosu dárcovské HLA molekuly s navázaným peptidem z alogenní buňky na autologní dendritickou buňku. Přenos celého komplexu (peptid – HLA) zajišťují endosomy přenášené mezi buňkami při přímém kontaktu. Předpokládá se, že polopřímá cesta také hraje roli ve vzniku rejekce transplantovaného orgánu, případně i reakce štěpu proti hostiteli. (Geneugelijk et al., 2014)

Th lymfocyty aktivované jak přímou tak nepřímou cestou mají svou nezastupitelnou roli i v aktivaci B-lymfocytů a tedy i v produkci protilátek proti danému antigenu. K aktivaci naivního B-lymfocytu je nezbytné, aby svým BCR receptorem rozpoznal cizí antigen, zpracoval jej a prezentoval na svých HLA molekulách II. třídy. Následně dojde k vazbě Th lymfocytu aktivovaného stejným antigenem na zmíněnou HLA molekulu. Vazba je navíc zpevněná kostimulačními molekulami CD40/CD40L. Tato vazba vede k produkci cytokinů (IL-21) a k následné konečné diferenciaci naivního B-lymfocytu na plasmocyt produkující protilátky. (Firl et al., 2017)

### 1.1.2. Další imunologicky důležité antigeny

#### 1.1.2.1. AB0 systém

Antigeny AB0 systému jsou exprimovány na povrchu erytrocytů. Preformované protilátky proti těmto antigenům se přirozeně vyskytují v lidském těle (jedinec s krevní skupinou A má protilátky proti skupině B a naopak). Tyto protilátky se označují jako izoaglutininy. Vazba izoaglutininů na antigeny na povrchu erytrocytů spouští sérii reakcí, které vedou k agregaci trombocytů a následně i dalších krevních elementů a ke spuštění komplementové kaskády, jak bude popsáno v kapitole „Komplement“. Tyto protilátky tudíž stojí i na začátku série reakcí, které vedou k vytvoření membrane-attack komplexu a v konečném důsledku i k lýzi erytrocytů. (Cozzi et al., 2017)

Transplantace orgánu od dárce s inkompatibilní krevní skupinou (tedy bez adekvátní imunologické přípravy) vede bez výjimky k akcelerované protilátkami-zprostředkované rejekci a k odhojení transplantátu.

#### 1.1.2.2. MICA a MICB antigeny

Geny pro MIC antigeny (Major Histocompatibility Complex Class I-related gene) se stejně jako geny pro HLA antigeny nacházejí na krátkém raménku 6. chromozomu v blízkosti genů kódujících HLA-B antigeny. MIC genů je známo celkem 6 (MICA – MICG), avšak pouze dva z nich kódují funkční proteiny (MICA a MICB). Tyto geny jsou polymorfní, i když v mnohem menší míře, než HLA antigeny; je známo celkem 69 alel MICA a 30 alel MICB, nicméně tato čísla nemusí být konečná. Neshoda dárce a příjemce v těchto antigenech může vyvolat protilátkami-zprostředkovanou rejekci, stejně jako v případě HLA antigenů, jak bude popsáno v kapitole „Rejekce“. (Luo et al., 2013)

### 1.2. Komplement

Komplement je jednou ze složek vrozené imunity, ale zároveň i nepostradatelnou složkou imunity adaptivní. Komplement byl nejprve identifikován jako termolabilní „komplementární“ složka séra, která má společně s protilátkami schopnost zabíjet bakterie. V současnosti jako komplement označujeme více než 30 solubilních i membránově-vázaných proteinů. Sérii reakcí vedoucích k utvoření tzv. membrane-attack komplexu, který způsobuje perforaci buněčné membrány, označujeme jako komplementovou kaskádu. Komplementová kaskáda může být spuštěna třemi různými způsoby: klasickou, alternativní a lektinovou cestou. Tyto tři cesty se liší primárně ve způsobu štěpení podjednotky C3. (Walport, 2001a) (Walport, 2001b)



### 1.2.1. Klasická cesta

Klasická cesta začíná vazbou protilátky typu IgG nebo IgM na antigen, na který se váže C1 komplex tvořený pěti molekulami: molekulou C1q, dvěma molekulami C1r a dvěma molekulami C1s. C1s štěpí podjednotku C4 – na C4a a C4b. C4b se následně váže k plasmatické membráně příslušné buňky. C1s dále štěpí podjednotku C2, při čemž dochází ke vzniku komplexu C4b2a, což je klasická C3 konvertáza. (Walport, 2001a) (Walport, 2001b)

### 1.2.2. Alternativní cesta

Alternativní cesta je závislá na samovolné vazbě C3b na membránu buněk. C3b v tomto případě vzniká po autokatalytickém štěpení podjednotky C3 – na C3a a C3b. C3b váže faktor B (homolog C2 podjednotky) a vzniká tak komplex C3bBb: alternativní C3 konvertáza. (Walport, 2001a) (Walport, 2001b)

### 1.2.3. Lektinová cesta

Lektinová cesta začíná vazbou enzymů MASP1 a MASP2 na molekuly manózy na povrchu bakteriálních buněk. MASP1 funguje podobně jako C1 komplex: dává vzniknout klasické C3 konvertáze, tedy C4b2a komplexu. MASP2 je schopen štěpit C3 přímo, neprodukuje tudíž jako mezikrok C3 konvertázu. (Walport, 2001a) (Walport, 2001b)

### 1.2.4. Vznik membrane-attack komplexu

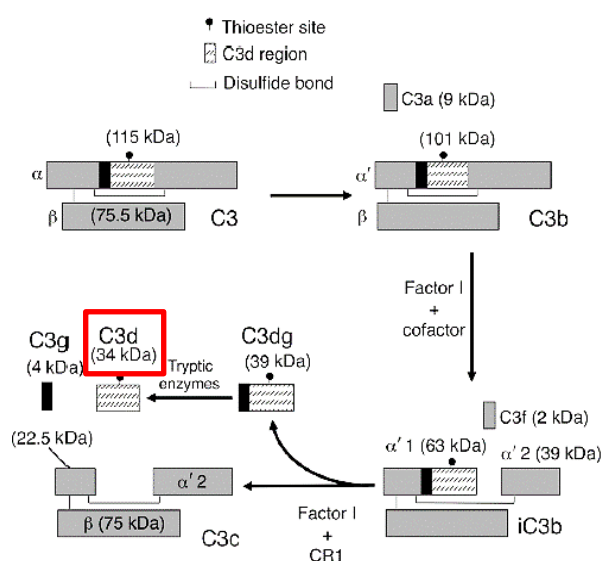
Klasická i alternativní C3 konvertáza a MASP2 protein štěpí C3 podjednotku – na C3a a C3b. Uvolněné C3b pak váže C4b a utváří tak C5 konvertázu, která dále štěpí C5 – na C5a a C5b. Štěpení C5 je první krok ve fázi vzniku membrane-attack komplexu (MAC), který je složen z C5b, C6, C7, C8 a 13-18 molekul C9. (Walport, 2001a) (Walport, 2001b)

### 1.2.5. Podjednotky komplementové kaskády

Vzhledem k tématu této diplomové práce je třeba věnovat detailní pozornost podjednotkám C3d, C1q a C4d.

#### 1.2.5.1. C3d podjednotka

C3d podjednotka je konečný produkt štěpení C3 podjednotky. C3d je součástí C3b podjednotky. Tato podjednotka je součástí klasické i alternativní C5 konvertázy. C3d je schopna se vázat na komplement-vážíci protilátky podobně jako C1q. C3d proto může sloužit jako marker toho, zda je protilátka komplement-vážící či nikoliv. (Sicard et al., 2014) (Comoli et al., 2016)



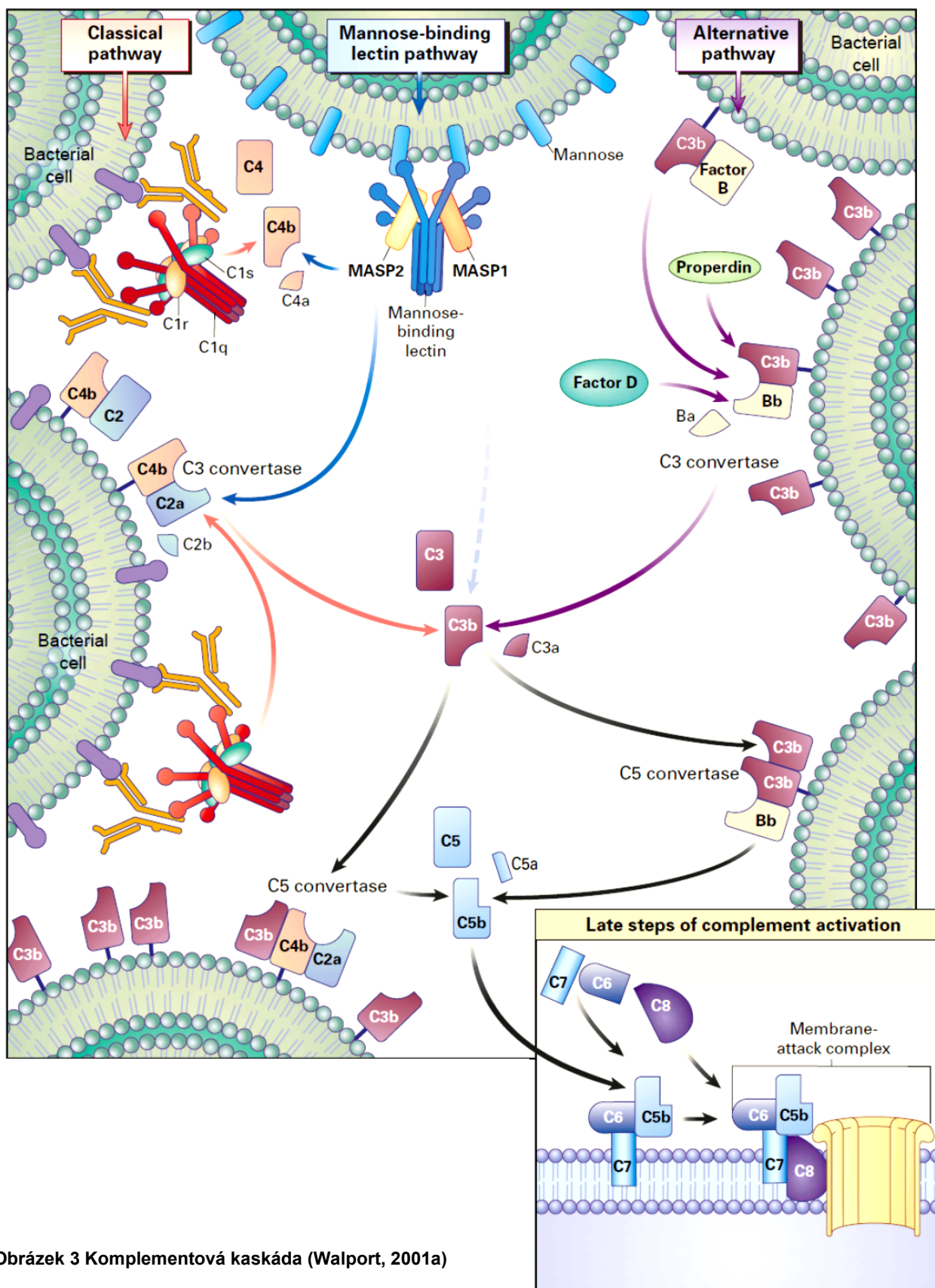
Obrázek 2 Štěpení C3 podjednotky (Thurman et al., 2013)

#### 1.2.5.2. C1q podjednotka

C1q podjednotka je nezbytná pro iniciaci klasické cesty komplementové kaskády. Tato podjednotka společně s dalšími čtyřmi molekulami (dvě molekuly C1r a dvě molekuly C1s) tvoří C1 komplex. Celý tento komplex je schopen navázat se na protilátku navázanou na antigen na povrchu buňky a spustit tak klasickou cestu komplementové kaskády, kdy dochází ke štěpení C4 podjednotky, jak je popsáno výše. (Yell et al., 2015)

#### 1.2.5.1. C4d podjednotka

C4d podjednotka je konečný produkt štěpení C4 podjednotky a součást C4b konvertázy. C4d tvoří polypeptidový řetězec, který ukotvuje C4b podjednotku v buněčné membráně a zůstává v ní vázaný i poté, co je zbytek C4b odštěpen (tato část se nazývá C4c). C4d slouží jako marker protlátkami-zprostředkované rejekce. V případě alo/xenogenní transplantace komplement poškozuje primárně endotel cév transplantovaného orgánu a právě v endotelu kapilár dochází při protlátkami-zprostředkované rejekci k ukládání C4d depozitů. (Cohen et al., 2012)



Obrázek 3 Komplementová kaskáda (Walport, 2001a)

### 1.3. Rejekce

Akutní a chronická rejekce jsou nejčastější překážkou dlouhodobého přežití transplantovaných orgánů.

Nejčastějším důvodem vzniku rejekce je neshoda dárce a příjemce v HLA antigenech; roli však hrají i antigeny kódované mimo HLA systém. Kvůli extrémní variabilitě HLA molekul je nicméně často nutné přistoupit k transplantaci orgánů i s neshodami v několika lokusech.

Na rejekci se může podílet jak přirozená (NK buňky, monocyty, atd.), tak adaptivní imunita (T a B-lymfocyty, protilátky). Neshodné antigeny HLA mohou způsobit buněčnou i protilátkami prostředkovanou rejekci, může však dojít k výskytu obou typů rejekce současně. Na buněčné rejekci se podílí především T-lymfocyty, ale dále se však na ní mohou podílet i NK buňky nebo makrofágy. Protilátkami-zprostředkovaná rejekce je způsobena jak preformovanými, tak *de novo* vytvořenými protilátkami. (Ingulli, 2010) Kromě přímé vazby na antigen se mohou protilátky vázat i na imunitní buňky. Tento mechanismus se nazývá protilátkami-zprostředkovaná buněčná cytotoxicita. Protilátka se Fab částí naváže na cílovou buňku (respektive antigeny na ní); na Fc část protilátky se naváže imunitní buňka svým Fc receptorem. Tohoto mechanismu se účastní NK buňky, makrofágy, dendritické buňky, neutrofilní a eosinofilní granulocyty. (Zahavi et al., 2018)

Podle období nástupu rejekce rozlišujeme rejekci na akcelerovanou, akutní a chronickou.

#### 1.3.1. Akcelerovaná protilátkami-zprostředkovaná rejekce

Akcelerovaná protilátkami-zprostředkovaná rejekce nastává během minut až hodin po transplantaci. Je způsobena preformovanými protilátkami, většinou namířenými proti neshodným HLA antigenům dárce. K akcelerované protilátkami-zprostředkované rejekci dochází také v případě transplantace s neshodou v krevní skupině, pokud pacient není předem speciálně připraven na tento výkon (odstranění přirozených protilátek proti neshodné krevní skupině). (Wozniak et al., 2017)

K vyloučení možnosti vzniku akcelerované protilátkami-zprostředkované rejekce slouží tzv. cross-match test (complement-dependent cytotoxicity, CDC). Tento test probíhá tak, že se společně inkubuje sérum příjemce a lymfocyty dárce; v dalším kroku se přidá králičí sérum (zdroj komplementu). Pokud po uplynutí inkubační doby dojde k lýzi lymfocytů, definuje se u konkrétního pacienta vysoké riziko vzniku hyperakutní rejekce. (Althaf et al., 2017)

### 1.3.2. Akutní celulární rejekce

Celulární rejekce se vyskytuje častěji než protilátkami-zprostředkovaná rejekce. Vyskytuje se většinou v časném post-transplantačním období (tj. do tří měsíců po transplantaci), stává se však, že se vyvíjí i roky po transplantaci (většinou při noncompliance pacientů). (Roden et al., 2016)

Akutní celulární rejekce je zprostředkovaná cytotoxickými ( $CD8^+$ ) T-lymfocyty ( $T_c$ ) stimulovanými pomocí pomocných ( $CD4^+$ ) T-lymfocytů ( $T_h$ ).  $T_h$  lymfocyty rozpoznávají neshodné (primárně HLA) antigeny dárce prezentované buď přímo na antigen-prezentujících buňkách dárce (přímé rozpoznání) anebo na autologních APC (nepřímé rozpoznání). Aby bylo uvedené možné, musí u naivního  $T_h$  lymfocytu při vazbě MHC na APC a jejich TCR receptor současně dojít ke kostimulaci pomocí interakce  $CD28 - CD80/86$ . Maturované  $T_h$  lymfocyty produkují cytokiny;  $T_h1$  lymfocyty produkují mimo jiné  $IFN-\gamma$ , který stimuluje právě  $T_c$  lymfocyty a na dané místo atrahuje i další buňky, např. monocyty. Kromě toho mají  $CD4^+$  T-lymfocyty nezanedbatelnou cytotoxickou aktivitu (Ingulli, 2010)

### 1.3.3. Akutní protilátkami-zprostředkovaná rejekce

K akutní protilátkami-zprostředkované rejekci (AMR) dochází v časném post-transplantačním období (do 3 měsíců po transplantaci), může to však být i déle – měsíce i roky po transplantaci, zvláště u pacientů s noncompliance. (Vlaminck et al., 2004) Důvodem vzniku této reakce mohou být buď preformované protilátky proti neshodným HLA antigenům dárce, tzv. donor-specifické protilátky

(DSA), které nebyly detekovatelné v CDC testu (podprahové protilátky) anebo *de novo* produkované DSA po transplantaci (Reed et al., 2006)

Ke vzniku DSA dochází po interakci naivního B-lymfocyту právě s HLA antigenem dárce, který je neshodný s příjemcovými HLA antigeny. B-lymfocyty mají na svém povrchu BCR receptory. Pokud dojde k vazbě neshodného HLA antigenu na BCR naivního B-lymfocyту, dojde k internalizaci celého komplexu a maturaci B-lymfocyту. Pouze v případě, že je následně B-lymfocyt stimulován pomocí Th lymfocyту, který byl předem stimulován APC buňkou s navázaným peptidovým fragmentem příslušného HLA antigenu, dochází k vývoji B-lymfocyту v plasmatickou buňku produkující DSA přímo proti příslušnému HLA antigenu. (Pieper et al., 2013)

Přítomnost DSA v séru pacienta také slouží jako diagnostický marker protilátkami-zprostředkované rejekce u transplantace ledvin, jater, srdce a plic. (Valenzuela and Reed, 2017)

V případě vývoje AMR, respektive v případě rizika jejího vývoje (detekované protilátky proti HLA antigenům, protilátky proti inkompatibilní krevní skupině) je jedním z možných léčebných postupů plazmaferéza, tedy odstranění krevní plazmy. Odstraněním krevní plazmy příjemce současně dojde i k odstranění protilátek v ní obsažených. Další možností léčby je aplikace Rituximabu (monoklonální protilátka proti CD20 – marker B-lymfocytů). Tento lék způsobí eliminaci B-lymfocytů (tedy i protilátky produkujících plasmocytů) z těla pacienta. (Levine and Abt, 2012)

#### 1.3.4. Chronická rejekce

Chronická rejekce se vyvíjí v řádech měsíců až let po transplantaci. Z imunologických i neimunologických příčin dochází k poškození endotelu cév a tedy nižšímu průtoku krve transplantovaným orgánem. Poškození cév má tak za následek hypoxii ve štěpu, která vede k jeho poškození (postupná ztráta funkce). Tímto způsobem dochází k nahrazování zdravé tkáně nefunkční tkání fibrotickou, výrazně je proto omezeno správné fungování transplantovaného orgánu. (Libby and Pober, 2001)

Hlavními rizikovými imunologickými faktory vzniku chronické rejekce je neshoda v HLA antigenech a předchozí epizody akutní celulární či protilátkami-zprostředkované rejekce. (Libby and Pober, 2001)

### 1.3.5. Role komplementu v patologickém procesu rejekce

Komplement hraje roli v akcelerované a akutní protilátkami zprostředkované rejekci. Pokud jsou DSA komplement-vážíci, mohou způsobit právě akcelerovanou či akutní AMR což může mít za následek i selhání transplantovaného orgánu. (Althaf et al., 2017)

Jak bylo zmíněno v kapitole „Komplement“, jediné protilátky schopné vázat komplement jsou IgM a IgG. U IgG se jedná především o podtřídy IgG3 a IgG4, jejich výskyt v séru pacienta je spojen s častým výskytem AMR. Vliv jednotlivých podtříd IgG na transplantovaný orgán se liší. Závěry dosavadních studií uvádějí, že u transplantací ledvin se přítomnost IgG3 pojí s vývojem závažnějších forem AMR, než je tomu u IgG4. (Lefaucheur et al., 2016) Jak je tomu u transplantací jater, však dosud není známo a mělo by to být předmětem dalšího zkoumání.

Před několika lety proběhly studie zkoumající klinický význam komplement-vážících protilátek u pacientů po transplantaci ledvin. Jejich cílem bylo definovat klinický význam C1q a C3d-vážících protilátek. Závěrem těchto studií bylo, že C1q-vážíci (Loupy et al., 2013) i C3d-vážíci protilátky (Sicard et al., 2014) mají klinický význam jako prediktivní marker vývoje AMR u pacientů po transplantaci ledvin. Studie Kima a kol., 2018 navíc dospěla k závěru, že má klinický význam současně detekovat protilátky vážící C1q i C3d, protože každé z nich se pojí s vývojem jiných post-transplantačních komplikací. U pacientů s C1q-vážícími protilátkami bylo vyšší procento pacientů s tubulitidou, dlouhodobé přežívání štěpu však nebylo ovlivněno. U pacientů s C3d-vážícími protilátkami bylo ve větším počtu případů, než u C1q+ pacientů současně detekováno i C4d a z dlouhodobého hlediska byla přítomnost C3d-vážících protilátek spojena s horší funkcí štěpu. (Kim et al., 2018).

Klinický význam C1q i C3d-vážících protilátek u pacientů po transplantaci jater zatím není dostatečně prostudován. Studie z posledního roku však ukazují, že i u nich mají tyto protilátky klinický význam. Studie Couchonnala a kol., 2017



a Kozlowského a kol., 2017 došly k závěru, že přítomnost C1q i C3d-vážíčích protilátek u pacientů po transplantaci jater je spojena s horší funkcí a dlouhodobým přežíváním štěpu.

Blokace podjednotek komplementu je další možností léčby AMR. Humánní monoklonální protilátka Eculizumab namířená proti C5 podjednotce zabraňuje tvorbě MAC (viz kapitola „Komplement“) a tedy i jeho patologickému působení na buňky transplantovaného orgánu. (Levine and Abt, 2012) Tento lék se při léčbě AMR ukázal jako velmi účinný. (Stites et al., 2015)

## 1.4. Transplantace jater

Játra a jejich správná funkce jsou pro život nezbytná. Produkují celou řadu enzymů i jiných látek (koagulační faktory, albumin, atd.) nutných pro tělesný metabolismus; mají i detoxikační a imunologickou funkci.

V současné době neznáme žádný způsob, jak jejich funkci alespoň dočasně uměle nahradit, jako je tomu např. u ledvin a dialýzy. Bez funkčních jater pacient přežije jen několik dní.

### 1.4.1. Historie

Historie transplantací jater sahá až do šedesátých let minulého století. První transplantace jater u člověka byla provedena roku 1963 Tomasem Starzlem. Nebyla však byla úspěšná a pacient během operace zemřel. Ani žádná z následně provedených transplantací neskončila úspěchem – žádný z pacientů nežil po operaci déle než 23 dní. Pacienti dostávali stejná imunosupresiva, jaká se tehdy podávala po transplantaci ledvin, tedy azathioprin a kortikoidy. (Júnior et al., 2015)

První úspěšnou transplantaci jater provedl Thomas Starzl v roce 1967, kdy byl pacientovi spolu s ostatními imunosupresivy poprvé aplikován i antithymocitární globulin. Tento pacient žil více než rok a zemřel následkem rekurence původního onemocnění, tedy na hepatocelulární karcinom. (Júnior et al., 2015)

### 1.4.2. Anatomie

Játra jsou největším orgánem lidského těla, zaujímají 2 – 3% tělesné váhy. Anatomicky se dělí na dvě části – levý a pravý lalok. Tyto části jsou rozděleny Cantlieho linií. Laloky se dále dělí na segmenty, pravý lalok je tvořen segmenty II a III a levý lalok je tvořen segmenty I, IV – VIII. (Abdel-Misih and Bloomston, 2010)

Fyziologicky se dají játra rozdělit na dvě nezávislé části, žlučové cesty a jaterní parenchym. Každá z nich má různé cévní zásobení i regenerační kapacitu. Jaterní parenchym má značnou schopnost regenerace a krev je zásoben z portální žíly, tedy částečně odkysličenou krví pod nízkým tlakem. Žlučové cesty mají podstatně nižší regenerační kapacitu než jaterní parenchym. Krev jsou zásobeny z tepen, tedy okysličenou krví pod vyšším tlakem, než je krev z portální žíly. (Demetris et al., 2016)

### 1.4.3. Fyziologie

Jak bylo zmíněno v úvodu této kapitoly, játra produkují celou řadu enzymů nezbytných pro fungování tělesného metabolismu. Mezi tyto enzymy patří např. apolipoprotein A-II, který má nezastupitelnou roli v metabolismu lipidů (Dugué-Pujol et al., 2006), nebo glukokináza-2, která má důležitou roli v metabolismu sacharidů (Adeva-Andany et al., 2016). Játra dále exprimují i komponenty komplementu (Rezvani et al., 2014), syntetizují albumin (Ruot et al., 2000) a koagulační faktory. (Dhainaut et al., 2001)

Nesprávná funkce (poškození) jater vede k hromadění určitých látek v těle. Mezi tyto látky patří enzymy gama-glutamyltransferáza, aspartát aminotransferáza nebo alkalická fosfatáza. (Kunutsor et al., 2014) Dalším ukazatelem selhávání jater je vyšší hladina bilirubinu v krvi. Za normálních okolností je bilirubin navázán na albumin a po vazbě glukuronové kyseliny je transportován do střev. Ve střevech je dále metabolizován střevními bakteriemi, částečně resorbován a následně vyloučen. Při snižující se funkci jater tento proces probíhá s mnohem nižší efektivitou a bilirubin se hromadí v krvi. Normální hladina bilirubinu v krvi je 0,2-1,2 mg/dl krve. U pacientů se sníženou funkcí jater stoupá tato hodnota až nad 10mg/dl krve. (Hamoud et al., 2018)

#### 1.4.4. Transplantace

Transplantace jater patří mezi život zachraňující operace. Mezi nejčastější příčiny selhání jater, kvůli kterým jsou pacienti zařazeni na čekací listiny v Evropě a USA patří hepatitida typu C, alkoholové poškození a hepatocelulární karcinom. (Goldberg et al., 2017)

V minulosti byla játra transplantována pouze v celku a od kadaverózních dárců. V takovém případě bylo nutno transplantovat játra pouze příjemci přibližně stejných tělesných proporcí, jako byl zemřelý dárce. Ideálně by měl štěp vážit mezi 0,8 – 2% hmotnosti příjemce. (Akdur et al., 2015) Není-li tento poměr dodržen, je zde riziko vzniku tzv. „large-for-size“ (LFSS) nebo „small-for-size“ (SFSS) syndromu.

SFSS je diagnostikován při hladině bilirubinu v krvi pacienta vyšší než 10mg/dl krve. Mezi další symptomy patří přítomnost ascytu, krvácení z gastrointestinálního traktu a ve vážných případech i selhání ledvin. Jako tzv. „small-for-size“ je definován štěp vážící méně než 0,8% hmotnosti příjemce. (Shoreem et al., 2017)

Největší komplikace při LFSS je riziko vzniku abdominálního kompartment syndromu, jelikož příjemcova dutina břišní je pro štěp příliš malá. Kompartment syndrom může vést k nedostatečnému cévnímu zásobení štěpu, které vede k hypoxii a následně i k nekróze štěpu. Jako tzv. „large-for-size“ je definován štěp vážící více než 4% hmotnosti příjemce. (Akdur et al., 2015)

Riziko vzniku LFSS bylo v minulosti hlavní příčinou úmrtí především pediatrických pacientů na čekacích listinách pro transplantaci jater. V dnešní době se však tato čísla podstatně snížila díky metodě splitování, respektive redukce jater. Metoda redukce umožňuje transplantovat játra od dospělého dárce pediatrickému pacientovi, jelikož se transplantuje pouze část jater dárce. Avšak při redukci se zbylá část jater netransplantuje, nový štěp dostane jen jeden pacient. Při splitování je jeden orgán rozdělen na dvě části a transplantován dvěma pacientům.

Játra je možno splitovat dvěma různými způsoby. Klasickým způsobem je rozdělení na rozšířený pravý segment (segmenty I a IV – VIII) pro dospělého pacienta a levý laterální segment (segment II a III) pro pediatrického pacienta. Další možnost dělení je podél Cantlieho linie. Tímto dělením vzniklá pravá část, která je tvořena segmenty

I – IV, a levá část, kterou tvoří segmenty V – VIII. Obě části se transplantují dospělým pacientům. (Liu et al., 2016)

Díky metodě splitování je možné transplantovat část jater i od živého dárce.

Mezi typické postoperativní komplikace po transplantaci jater patří problémy se žlučovými cestami (úniky žluči, změna stavby žlučových cest), cévní poškození, vznik trombů nebo krvácení. Na základě mnoha studií nebyl zjištěn signifikantní rozdíl ve výskytu těchto komplikací u pacientů, kteří obdrželi štěp celý nebo splitovaný/redukovaný. Vzácně se však po transplantaci splitovaných jater vyskytuje SFSS syndrom. (Wan et al., 2015) (Laurence et al., 2015) (Moussaoui et al., 2017)

#### 1.4.5. Imunologie jater

Žlučové cesty a jaterní parenchym se značně liší i z imunologického hlediska. Jaterní parenchym má poměrně slabou expresi MHC antigenů I. třídy a kostimulačních molekul, jelikož je vystaven velkému množství mikrobiálních antigenů pocházejících ze střev. (Demetris et al., 2015) Jaterní parenchym také obsahuje velký počet imunitních buněk, makrofágy, B a T-lymfocyty, NK a NKT buňky. Expresí MHC antigenů buňkami žlučových cest je vyšší než u hepatocytů. Některé viry mohou u hepatocytů zvýšit expresi MHC antigenů I. i II. třídy. Mezi tyto viry patří CMV nebo EB virus (Bogdanos et al., 2013) (Demetris et al., 2016)

NK buňky tvoří až 50% veškerých jaterních lymfocytů, jejich hlavním úkolem je pravděpodobně zabíjet hepatocyty poškozené např. ischemií, viry, nebo ty, co nesou maligní značky. Jaterní NK buňky se liší od ostatních tělních NK buněk. Neexprimují CD16, nicméně exprimují větší množství TRAIL, perforinu a granzymu B. Závěry dosavadních studií uvádějí, že dárcovské NK buňky přítomné ve štěpu a následně i v krvi příjemce mají imunosupresivní účinky na příjemcův imunitní systém, a proto snižují riziko rejekce. Zatím není znám přesný mechanismus tohoto jevu, nejpravděpodobnějším vysvětlením však je, že dárcovské NK buňky zabíjejí příjemcovy imunitní buňky dříve, než napadnou transplantovaný orgán. (Harmon et al., 2016) (Fahrner et al., 2016)

NKT buňky tvoří 10 – 15% veškerých jaterních lymfocytů. Jejich hlavní funkcí v játrech je produkovat cytokiny, např. IL-13 a IL4. (Fahrner et al., 2016)

Makrofágy typické pro jaterní parenchym – Kupfferovy buňky, tvoří přibližně 15% veškerých jaterních buněk a 50% všech tělních makrofágů. Tyto buňky jsou schopné pohlcovat širokou škálu částic: poškozené erytrocyty, opsonizované částice či patogeny (částice opsonizované mimo jiné pomocí C3b podjednotky komplementu) i imunokomplexy. Jejich hlavní funkcí je odstraňovat právě tyto částice z řečiště portální žíly (Demetris et al., 2016) (Campagne et al., 2007) Další důležitou funkcí Kupfferových buněk je produkce cytokinů, mimo jiné IL-1, IL-6, IL12, IL-18. (Fahrner et al., 2016) Právě IL-6 má důležitou funkci v regeneraci jater po transplantaci. (Luo et al., 2015) Působení IL-34, jenž je exprimován jaterními buňkami, polarizuje Kupfferovy buňky v M2 fenotyp. Tento fenotyp má imunosupresivní vlastnosti, neboť produkuje imunosupresivní cytokiny IL-10 a TGF- $\beta$ . Působení IL-34 a tedy přítomnost M2 fenotypu Kupfferových buněk má imunosupresivní účinky a snižuje riziko vzniku protilátkami-zprostředkované rejekce transplantovaných jater. (Zhao et al., 2018) (Tacke, 2018)

#### 1.4.6. Diagnostika rejekce

Rejekce transplantovaných jater se diagnostikuje podle tzv. Banffské klasifikace. Jednotná kritéria pro diagnostiku rejekce byla poprvé stanovena roku 2011 a od té doby se stále vyvíjí. Játra jsou proti AMR do určité míry odolná. Tato odolnost souvisí s jejich značnou regenerační schopností, velkým povrchem (ředění protilátek) a přítomností Kupfferových buněk (odstranění imunokomplexů a buněk opsonizovaných komplementem). (Demetris et al., 2016)

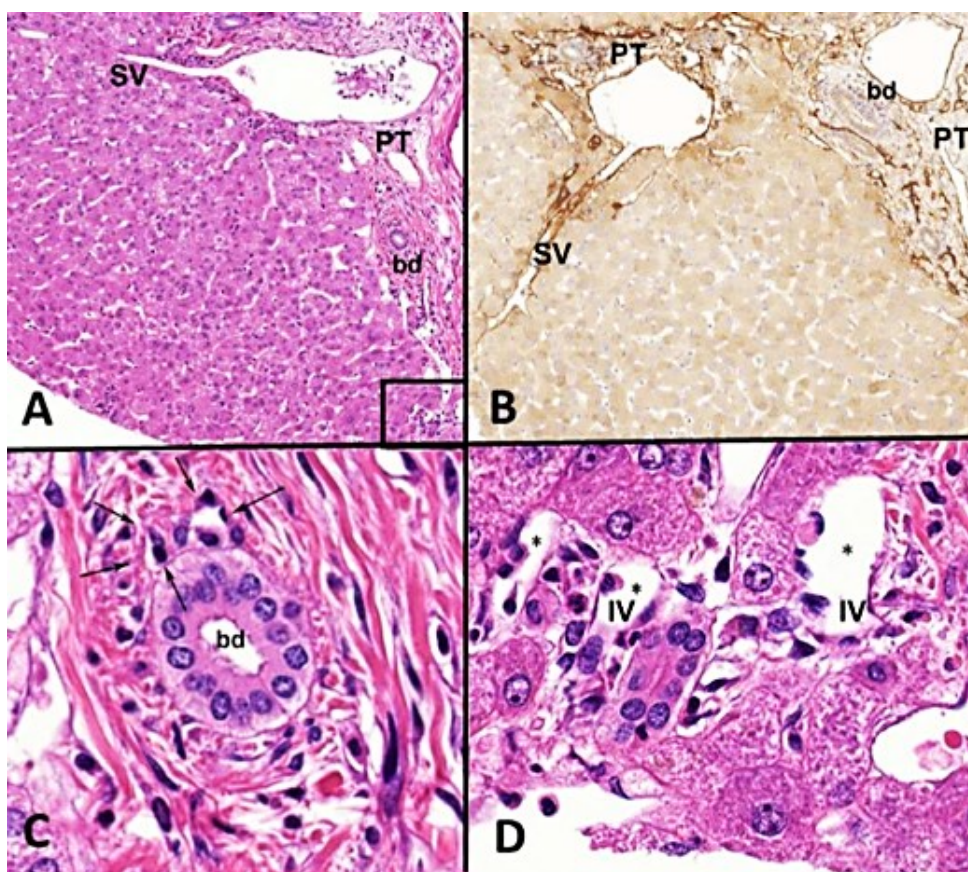
Jedním z hlavních diagnostických markerů pro diagnózu AMR jsou C4d depozity v endotelu portální žíly a jaterních kapilár. Přítomnost C4d se považuje za důkaz vazby protilátky na antigen a následné aktivace komplementové kaskády. (Demetris et al., 2016)

Dalším důležitým diagnostickým markerem je přítomnost DSA v krvi. Pro diagnózu AMR je důležitá současná přítomnost DSA a C4d depozitů. Toto pravidlo však neplatí absolutně. U jater ani u jiných orgánů se C4d depozity nevyskytují ve všech

případech, kdy dochází k AMR. U ledvin až v 50% případů, kdy došlo k AMR chybí C4d depozity v endotelu cév. (Tait et al., 2013) (Haas et al., 2014)

Důležitým diagnostickým markerem AMR je i stav žlučových cest. Jak je uvedeno výše, žlučové cesty nemají tak silnou regenerační schopnost jako jaterní parenchym. Při probíhající AMR mají cévy zásobující žlučové cesty poškozený endotel a jsou infiltrovány imunitními buňkami.

Mezi diagnostické markery AMR patří i zvýšený výskyt plasmocytů a eozinofilů v jaterní tkáni, apoptóza hepatocytů, centrolobulární hepatocelulární otok a rozšíření jaterních kapilár. (Demetris et al., 2016)



Obrázek 4 Biopstický vzorek jaterní tkáně u závažné AMR

A – Histologický preparát po obarvení eosinem a hematoxylinem

B – Imunohistochemická detekce C4d depozitů – nález je pozitivní (C4d se po reakci zbarví do hněda)

C – Kapilára žlučových cest (detail A) – infiltrace monocyty, hypertrofie endotelu

D - Kapilára jaterního parenchymu (detail A) – infiltrace monocyty, hypertrofie endotelu

Celkový nález prokazuje jasnou AMR

## 2. Cíle práce

Předložená diplomová práce měla za cíl zjistit klinický význam komplement-vážících protilátek proti HLA antigenům a analyzovat, zda mají tyto protilátky význam pro predikci vývoje protilátkami-zprostředkované rejekce u pacientů po transplantaci jater.

Dílčí cíle diplomové práce:

1. Stanovit specifitu protilátek proti HLA antigenům v sérech pacientů po transplantaci jater.
2. Provést analýzu s cílem zjistit, zda jsou protilátky donor-specifické (DSA) anebo non-donor-specifické (non-DSA).
3. Rozlišit zmíněné protilátky na komplement-vážící a komplement-nevážící dvěma různými technikami a porovnat výsledky získané pomocí těchto dvou souprav.
4. Porovnat výsledky analýzy protilátek s klinickým stavem pacientů, respektive s tím, jestli u nich došlo k vývoji celulární a protilátkami-zprostředkované rejekce či nikoli.
5. Provést předběžnou analýzu s cílem zjistit zda lze komplement-vážící DSA a non-DSA použít jako prediktivní marker vzniku protilátkami zprostředkované rejekce u pacientů po transplantaci jater.

### 3. Experimentální část

#### 3.1. Materiál a metody

##### 3.1.1. Soubor pacientů

Do studie bylo zařazeno 124 pacientů, kterým byla mezi lety 2015 až 2017 transplantována játra. V séru pacientů byly měřeny hladiny protilátek proti HLA antigenům. Séra byla analyzována před transplantací a 3, 6 a 12 měsíců po transplantaci. Vzorky byly získávány po centrifugaci z plné srážlivé krve. Přítomnost a specifita protilátek byla analyzována X-map technologií (přístrojem Luminex) za použití souprav LABScreen Mixed a LABScreen Single antigen pro I. a II. třídu HLA antigenů (výrobce One Lambda Inc., Canoga Park, USA).

Pacienti, u kterých byla touto metodou prokázána přítomnost protilátek proti HLA antigenům, byli dále analyzováni na přítomnost komplement-vážících protilátek. K této analýze byla opět použita X-map technologie. K analýze byly použity dvě různé soupravy: C1q Screen (výrobce One Lambda Inc., Canoga Park, USA) pro detekci C1q-vážících protilátek a LIFECODES C3d detection test (výrobce Immucor GTI Diagnostic Inc., Waukesha, USA) pro detekci C3d-vážících protilátek.

HLA typizace dárců i příjemců je známá, tudíž je možné rozlišit zjištěné protilátky na donor-specifické (DSA) a non-donor-specifické (non-DSA). Analýza se provádí tak, že se porovnává zjištěná specifita HLA protilátek s neshodnými HLA antigeny dárců orgánů.

Klinický stav pacientů byl zkontrolován u všech pacientů zahrnutých do studie. Bioptické údaje o vzniku rejekce byly k dispozici u 94 ze 124 pacientů, kteří byli do této studie zahrnuti.



### 3.1.2. X-map technologie

X-map technologie patří k běžným analyzačním technikám užívaným v klinické imunologii. Tato metoda je poměrně rychlá a při jediném měření umožňuje multifaktoriální analýzu vzorků. Její další výhodou je i její vyšší citlivost oproti CDC testu nebo metodě ELISA.

Daná technologie využívá k detekci protilátek fluorescenčně značené polystyrenové kuličky, které jsou konjugované s HLA antigeny I. a / nebo II. třídy, podle typu testu definované na úrovni alel (subtypů HLA antigenů). Na tyto antigeny se váží protilátky (lidské IgG), které jsou následně označeny fykoerytrinem (PE) navázaným na sekundární protilátce a detekovány v přístroji Luminex.

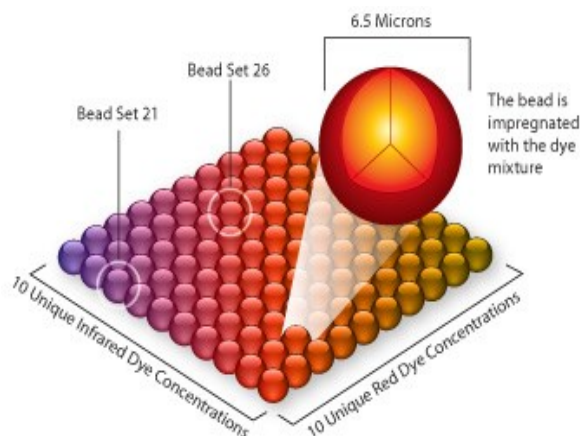
Jádro polystyrenových kuliček obsahuje dvě fluorescenční barviva v různých koncentracích, která po ozáření laserem svítí s různou intenzitou. Díky tomu je možné rozlišit různé podskupiny kuliček (až 100 různých).

Dnes již existují kuličky, které ve svém jádře obsahují i tři různá barviva; v této studii však nebyly použity.

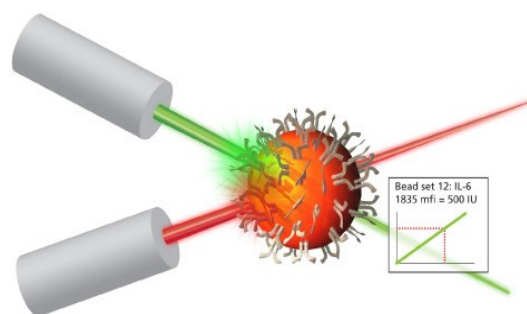
Při každém měření je současně testováno i negativní kontrolní sérum, aby bylo možné stanovit pozadí pro každou jednotlivou skupinu kuliček.

Výsledné hodnoty se udávají v hodnotách MFI (mean fluorescence intensity). Tato hodnota udává medián intenzity fluorescence měřených kuliček a vypovídá tedy o relativní hladině protilátek v měřeném vzorku.

Přítomnost C1q podjednotky komplementu v séru je spojena s tzv. efektem prozóny, v jehož důsledku mohou být detekované hladiny protilátek nižší, než zkoumané vzorky reálně obsahují. Důsledkem efektu prozóny může být i to, že některé vzorky mohou být chybně identifikovány jako negativní. Tento efekt způsobuje C1q-zprostředkovaná tvorba imunokomplexů, které následně brání vazbě příslušných protilátek na výše specifikované kuličky, respektive na antigeny na nich navázané. Proto je vhodné před mísením kuliček a měřených sér z nich C1q odstranit. Odstranění C1q lze dosáhnout chelačními činidly (např. EDTA), jelikož C1q je stabilizováno pomocí  $\text{Ca}^{2+}$ , případně i inkubací sér při 56°C, jelikož C1q je termolabilní a při této teplotě se rozpadá. (Anani et al., 2016)



**Obrázek 5** Vysvětlení variability Luminexových kuliček  
Převzato z ThermoFisher.com



**Obrázek 6** Detekce kuliček pomocí laserů  
Převzato z ThermoFisher.com

### 3.1.3. Porovnání C1q Screen a LIFECODES C3d Detection testu

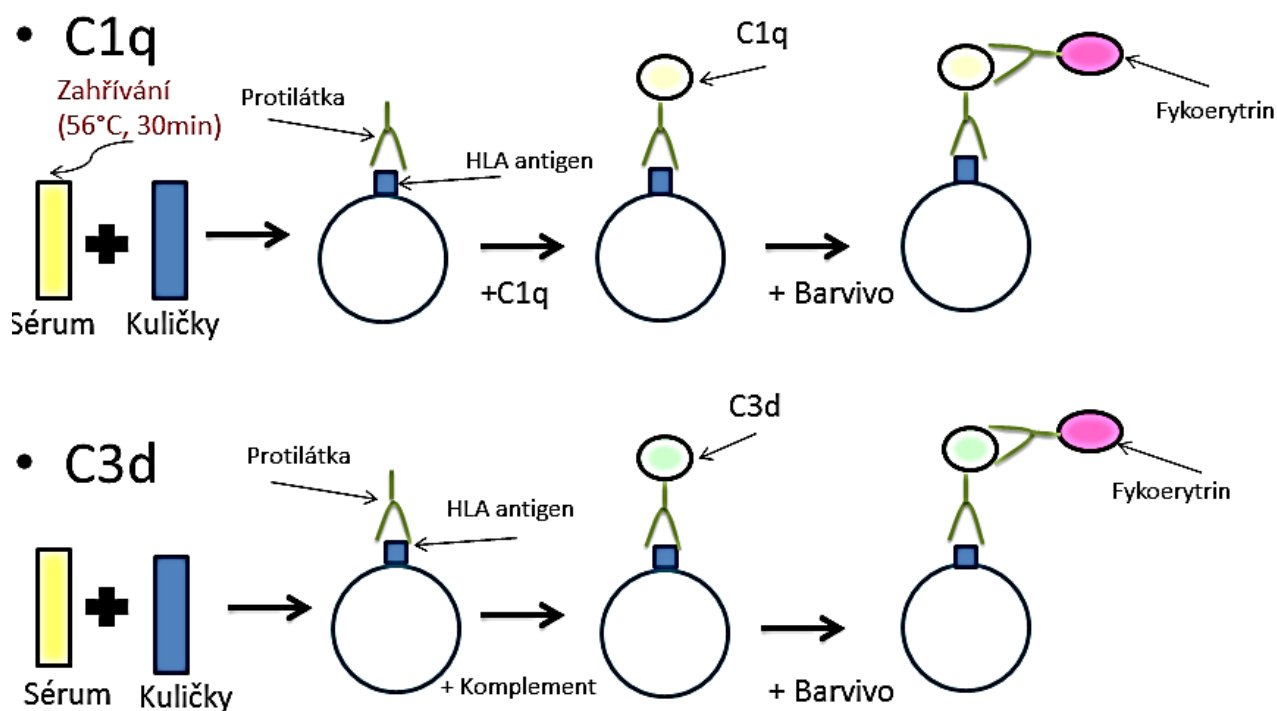
Jak bylo zmíněno výše, dílčím cílem této práce bylo porovnat dvě různé soupravy pro detekci komplement-vážících protilátek, C1q Screen a LIFECODES C3d Detection test a analyzovat tyto výsledky v souvislosti s klinickým průběhem po transplantaci. C1q Screen detekuje C1q podjednotku komplementu, což je molekula uplatňující se v iniciaci klasické cesty komplementové kaskády. LIFECODES C3d Detection test stanovuje C3d podjednotku, což je molekula hrající roli až v pozdější fázi komplementové kaskády. Je to součást C3b podjednotky, která tvoří C5 konvertázu. C3d je štěpným produktem všech tří možných cest aktivace komplementové kaskády, tj. klasické, lektinové i alternativní. Přítomnost C1q jednoznačně nezaručuje, že došlo k iniciaci klasické cesty komplementové kaskády, přítomnost C3d toto zaručuje.

Přesné pracovní postupy pro testy C1q Screen a LIFECODES C3d detection test jsou uvedeny níže. Zde jsou prezentovány pouze dva hlavní rozdíly mezi nimi.

U C1q Screen testu je třeba sérum pacientů inkubovat 30 minut při 56°C, aby došlo k inaktivaci komplementu již přítomného v séru. Takový krok v pracovním postupu pro LIFECODES C3d Detection testu není.

Testy se dále liší v tom, zda se přidává pouze C1q podjednotka nebo kompletní lidské sérum (komplement).

Obě metody jsou popsány v obrázku 8.



Obrázek 7 Porovnání C1q Screen a LIFECODES C3d Detection testu

### 3.2. Materiál a přístroje použité při testování

#### 3.2.1. Materiál a chemikálie:

1. Séra pacientů odebraná z centrifugované srážené krve
2. Použité soupravy od firmy One Lambda:
  - a. LABScreen Mixed
    - Směs kuliček s navázanými HLA antigeny I. i II. třídy
    - 10x koncentrovaný promývací roztok
  - b. LABScreen Single Antigen Class I. Antibody Detection
    - Směs kuliček pokrytých HLA antigeny I. třídy
    - 10x koncentrovaný promývací roztok
  - c. LABScreen Single Antigen Class II. Antibody Detection
    - Směs kuliček pokrytých HLA antigeny II. třídy
    - 10x koncentrovaný promývací roztok
  - d. C1q Screen
    - C1q pozitivní kontrolní kuličky
    - HEPES pufr
    - C1q podjednotka komplementu
    - Protilátky proti C1q s navázaným PE
  - e. LABScreen Negative Control Serum
  - f. C1qScreen Class I Positive Control Serum
  - g. C1qScreen Class II Positive Control Serum
  - h. C1qScreen Negative Control Serum
  - i. PE-Conjugated Goat Anti-Human IgG
3. Použité soupravy od firmy Immucor
  - a. LIFECODES LSA Single Antigen Class I
    - Směs kuliček pokrytých HLA antigeny I. třídy
    - Negativní kontrolní sérum
    - Promývací roztok
  - b. LIFECODES LSA Single Antigen Class II
    - Směs kuliček pokrytých HLA antigeny I. třídy
    - Negativní kontrolní sérum
    - Promývací roztok

c. LIFECODES C3d Detection

- C3d pozitivní kontrolní kuličky
- Lidský komplement
- Protilátky proti C3d s navázaným PE

4. Uniplate 96-jamkové destičky white polystyren (Whatman)
5. 96-jamkové destičky Millipore Multiscreen (EMD Millipore)
6. Fólie na PCR destičky
7. Hliníkové fólie
8. Mikrozukavky, pipety, špičky a běžný laboratorní materiál
9. Phosphate buffer saline (PBS)
10. Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)
11. Destilovaná voda

3.2.2. Přístroje a software:

1. Centrifuga CL 30 s rotorem na PCR desky, Thermo electron
2. Centrifuga Minispin+, Eppendorf
3. Luminex 200 IS 2.3, One Lambda
4. Třepačka ZX3, Velp Scientifica
5. Vakuová odsávačka PALL
6. Analyzační program HLA Fusion
7. Analyzační program Match It! Antibody

### 3.3. Pracovní postup

#### 3.3.1. Stanovení protilátek proti HLA antigenům.

Pracovní postup pro užití souprav LABScreen Mixed a LABScreen Single Antigen pro I. i II. třídu je stejný.

Prvním krokem v daném postupu je smísit v mikrozkušavce 95 $\mu$ l séra a 5 $\mu$ l EDTA. Tato směs je následně centrifugována po dobu 5 minut při 8000g. Po centrifugaci je přeneseno 20 $\mu$ l dané směsi do Whatman Uniplate 96-jamkové destičky. Do jedné z jamek destičky je místo séra od pacienta pipetováno 20 $\mu$ l negativního kontrolního séra (LABScreen Negative Control Serum). Obsah mikrozkušavky s kuličkami je promícháván minimálně po dobu 5 minut, aby došlo k resuspendaci kuliček obsažených v roztoku. K séru v jamkách 96-jamkové destičky je následně přidáno 5 $\mu$ l suspenze kuliček; destička je přikryta neprůhlednou fólií. Sérum s kuličkami je následně inkubováno po dobu 30 minut.

Během inkubace je naředěn zásobní promývací roztok (10x koncentrovaný) destilovanou vodou (roztok je součástí soupravy). Následně je naředěn i zásobní roztok PE (100x koncentrovaný) pomocí naředěného promývacího roztoku.

Po uplynutí inkubační doby je ke směsi v jamkách přidáno 150 $\mu$ l promývacího roztoku. Destička je poté centrifugována po dobu 5 minut při 1300g. Po centrifugaci je tekutina prudce vyklepnuta z destičky. Celý postup je zopakován ještě dvakrát s tím, že do jamek je přidáno 200 $\mu$ l promývacího roztoku.

Po posledním promývání je do každé jamky destičky přidáno 100 $\mu$ l naředěného roztoku PE. Směs je inkubována dalších 30 minut.

Po inkubaci následuje promývání výše popsáním způsobem.

Po promývání je do každé jamky přidáno 80 $\mu$ l PBS.

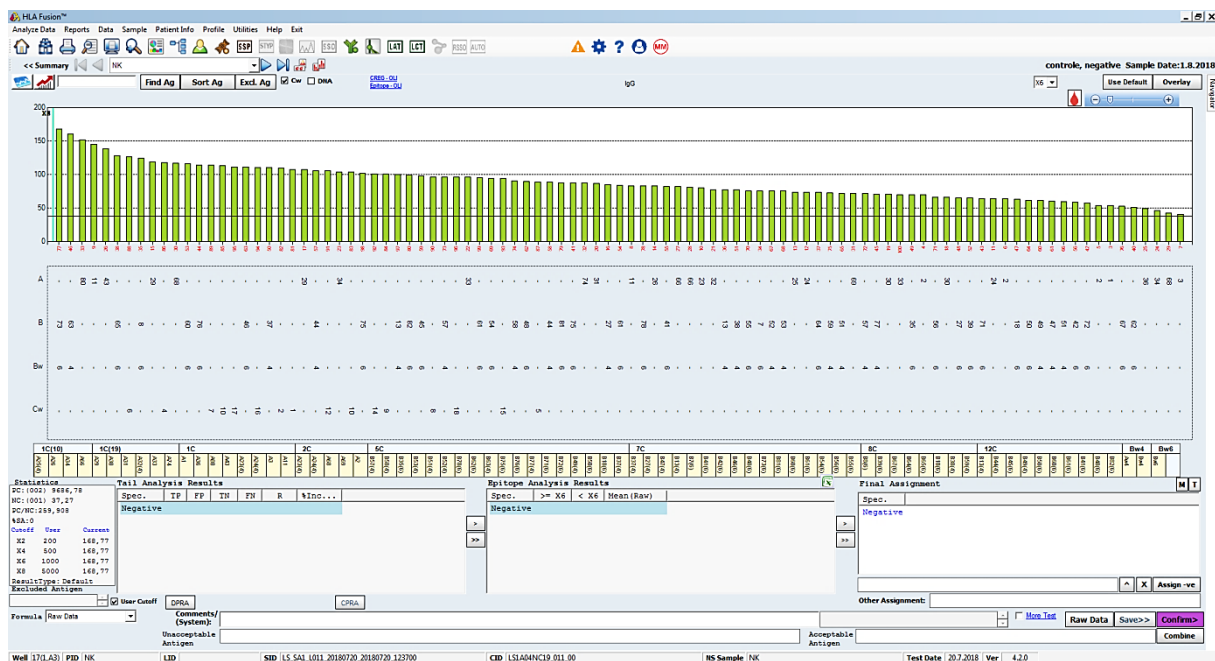
Následuje měření na Luminexu, pro každou šarži kuliček je nastaven zvláštní měřicí protokol. Data jsou analyzována v programu HLA Fusion.

### 3.3.2. Analýza dat programem HLA Fusion

Směs kuliček obsahuje pozitivní a negativní kontrolní kuličky. Hodnoty fluorescence u negativních kontrolních kuliček nesmějí překročit 500 MFI, u pozitivních kontrolních kuliček hodnoty MFI nesmějí být nižší než 5000. Pro určení pozadí při jednotlivých testech se používá výše zmíněné negativní kontrolní sérum. Hodnota fluorescence v negativním kontrolním séru nesmí překročit 500 MFI u žádné z kuliček. Pokud by zmíněné hodnoty překročily uvedenou hranici, bylo by třeba testování zopakovat.

U testování pomocí LABScreen Mixed je hranice, od které jsou naměřené hodnoty považovány za pozitivní, nastavena jako fluorescence kuliček překračující 500 MFI u HLA antigenů I. třídy a 1000 MFI u HLA antigenů II. třídy. Testem provedeným pomocí LABScreen Mixed však lze získat pouze semikvantitativní hodnoty koncentrace protilátek v séru pacientů.

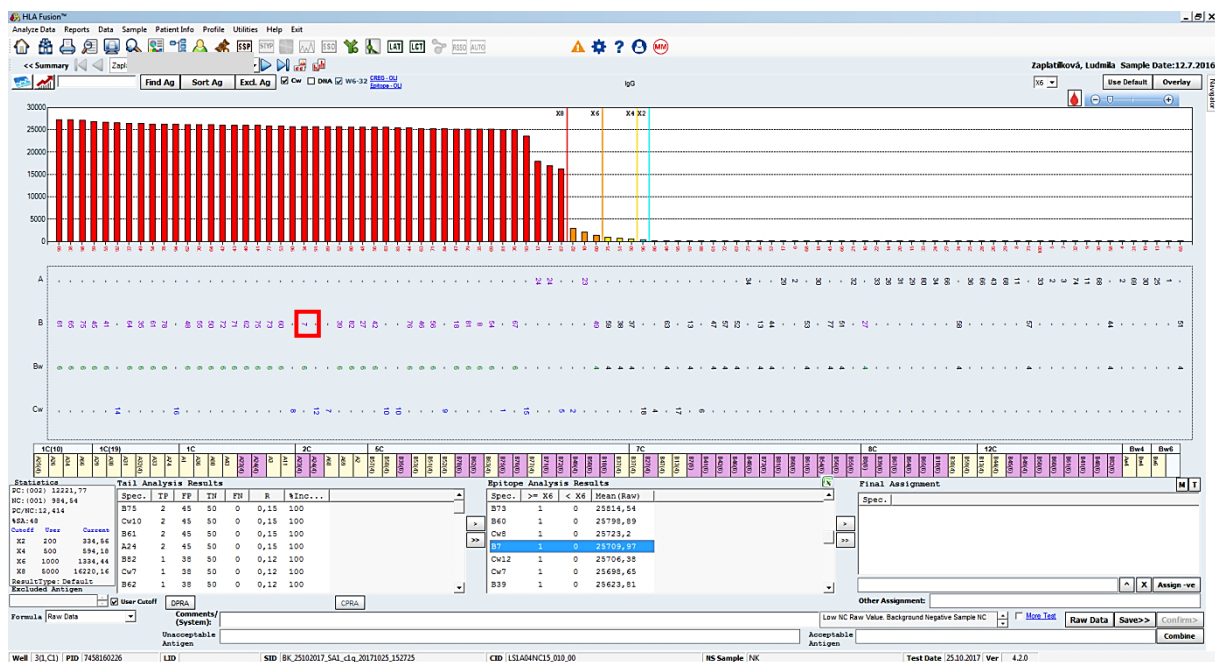
Pacienti, kteří byli při testování pomocí LABScreen Mixed detekováni jako pozitivní, jsou dále testováni pomocí LABScreen Single Antigen pro I. či II. třídu – v závislosti na výsledku předchozího měření. U těchto souprav se hranice fluorescence kuliček, od které jsou vzorky považovány za pozitivní na výskyt daných protilátek, liší. U HLA antigenů I. třídy je tato hranice 1000 MFI a u HLA antigenů II. třídy 2000 MFI (validace cut off hodnot byla provedena extenzivně v HLA laboratoři). Tyto hodnoty se v různých transplantačních centrech liší.



Obrázek 8 Ukázka analýzy dat v HLA Fusion - negativní kontrola

Negativní kontrolní kuličky = 37 MFI

Pozitivní kontrolní kuličky = 9686 MFI



Obrázek 9 Ukázka analýzy dat v HLA Fusion - pacient s pozitivním nálezem (protilátky proti I. třídě HLA)

Negativní kontrolní kuličky = 37 MFI

Pozitivní kontrolní kuličky = 12221 MFI

DSA = B\*07 = 25709 MFI (červený rámeček)



### 3.3.3. Stanovení C1q-vážíčích protilátek

Přítomnost C1q- vážíčích protilátek byla testována pouze u sér, u kterých byly technikou LABScreen Single Antigen pro I. i II. třídu zjištěny protilátky proti HLA-antigenům.

Prvním krokem tohoto testu je přenést 40μl séra do 1,5ml mikrozkušavky a inkubovat jej 30 minut při teplotě 56°C. Zkušavky se sérem jsou následně centrifugovány po dobu 10 minut při 8000g.

Dalším krokem je smísit HLA kuličky (obsažené v soupravách LABScreen Single Antigen pro I. /II. třídu) s C1q pozitivními kontrolními kuličkami v poměru 10:1 (tzn. 5μl HLA kuliček + 0,5μl C1q pozitivních kontrolních kuliček pro každý vzorek). Oba druhy kuliček musejí být před mísením resuspendovány minimálně po dobu 5 minut.

Dále je nutné si předpřipravit roztok C1q v HEPES pufru v poměru 1:4 (tzn. 1μl C1q a 4μl HEPES pufru pro každý vzorek).

V následujícím kroku se do Whatman Uniplate 96-jamkové destičky přenese 5μl séra. Do dalších jamek destičky se přenese 5μl negativního C1q kontrolního séra a 5μl pozitivního C1q kontrolního séra pro I. /II. třídu HLA antigenů – v závislosti na typu testu. Dále je k sérum přidáno 5μl předpřipravené směsi C1q v HEPES pufru a dalších 5μl předpřipravené směsi kuliček. Destička je následně zakryta neprůhlednou fólií, a celá směs je inkubována po dobu 30 minut.

Po uplynutí inkubační doby se destička krátce centrifuguje na 1000g a ke směsi v jamkách se poté přidává 5μl protilátky proti C1q s navázaným PE, který je rovněž obsažen v C1q Screen soupravě. Vzniklá směs inkubována dalších 30 minut.

Po uplynutí inkubační doby je destička krátce centrifugována na 1000g a do jamek je přidáno 80μl PBS. Destička je centrifugována po dobu 5 minut na 1300g, poté je tekutina z destičky krátce prudce vyklepnuta a do jamek je přidáno dalších 80μl PBS. Následuje měření na Luminexu, pro každou šarži kuliček je nastaven zvláštní měřicí protokol. Analýza naměřených dat probíhá v programu HLA Fusion.

### 3.3.4. Analýza dat v programu HLA Fusion

Data získaná C1q Screen testem jsou analyzována stejným způsobem jako data získaná pomocí LABScreen Single Antigen pro I. i II. třídu. U C1q Screen jsou jako pozitivní/negativní určeny stejné hodnoty MFI jako u LABScreen Single Antigen pro I. i II. třídu. Jediné rozdíly jsou v tom, že u C1q Screen je nutné navíc používat pozitivní kontrolu, aby bylo možné ověřit, zda došlo k navázání C1q podjednotky na C1q-vážíci protilátky obsažené v séru. K tomuto účelu se používá C1q Screen positive control serum pro I. /II. třídu HLA antigenů – v závislosti na typu testu. Dále se pro tento test používá jiné negativní kontrolní sérum: používá se C1qScreen Negative Control Serum.

### 3.3.5. Stanovení koncentrace C3d-vážících protilátek

Na přítomnost C3d-vážících protilátek byla testována pouze séra, u kterých byla pomocí LABScreen Single Antigen pro I. / II. třídu prokázána přítomnost protilátek proti HLA-antigenům.

Prvním krokem tohoto testu je po dobu 5 minut centrifugovat séra na 8000g. Následně je nutno navlhčit jamky 96-jamkové destičky Millipore Multiscreen pomocí 200μl destilované vody.

Dalším krokem je minimálně po dobu 5 minut resuspendovat kuličky obsažené v soupravě LIFECODES LSA Single Antigen Class I / II a pozitivní kontrolní C3d kuličky (součást LIFECODES C3d Detection testu). Suspenze těchto dvou typů kuliček jsou následně smíseny v poměru 40:1 (tzn. 40μl LSA kuliček a 1μl pozitivních kontrolních C3d kuliček pro každý vzorek). Pomocí vakuové odsávačky je odstraněna voda z jamek 96-jamkové destičky, je do nich poté přeneseno 40μl směsi kuliček a 10μl séra. Do jedné jamky je přeneseno místo séra od pacienta negativní kontrolní sérum obsažené v soupravě LIFECODES LSA Single Antigen Class I / II. Destička je zakryta neprůhlednou fólií a směs je inkubována po dobu 30 minut. Po uplynutí inkubační doby je do každé jamky přidáno 30μl roztoku komplementu a vzniklá směs je inkubována po dobu dalších 30 minut.

Po uplynutí inkubační doby je do každé jamky přidáno 100µl promývacího roztoku (součást soupravy LIFECODES LSA Single Antigen Class I / II.), který je poté odsát na odsávačce. Následně je do každé jamky přidáno 200µl promývacího roztoku, který je rovněž následně odsán na odsávačce. Tento postup je opakován ještě dvakrát. Do každé jamky destičky je poté přidáno 50µl protilátky proti C3d s navázaným PE a vzniklá směs je inkubována po dobu 30 minut.

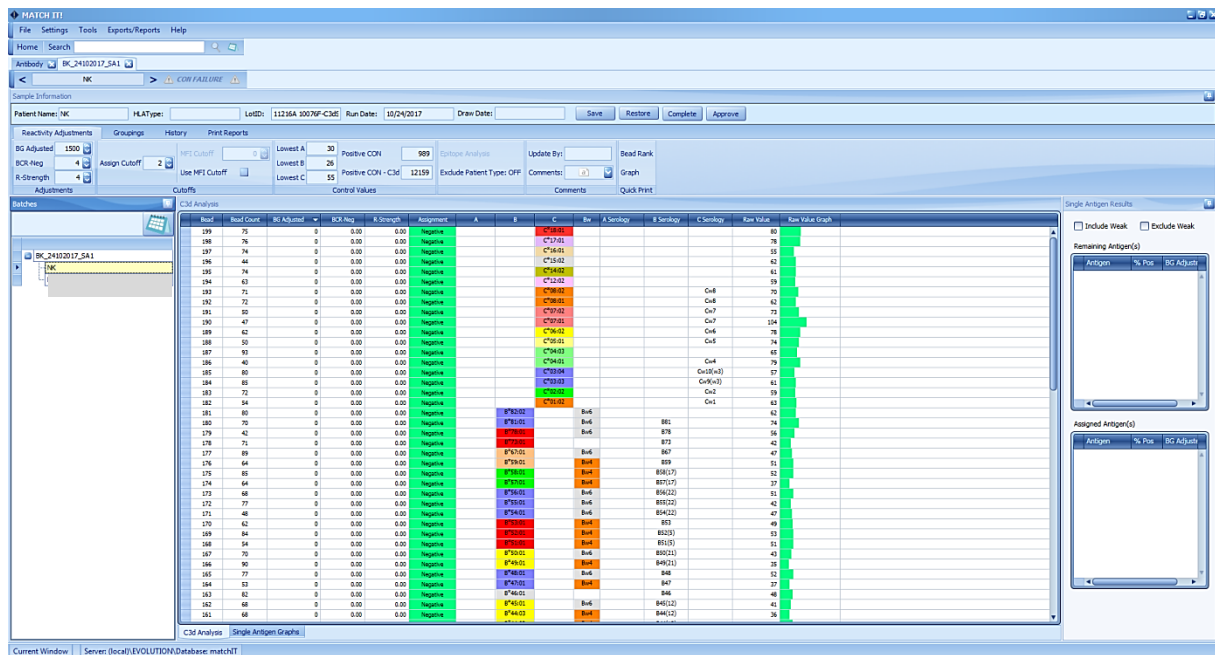
Po uplynutí inkubační doby jsou vzorky promyty stejným způsobem, jaký je uveden výše. Nakonec se do každé jamky přidá dalších 200µl promývacího roztoku. Následuje měření na Luminexu a analýza dat v programu Match It! Antibody. Pro každou šarži kuliček je třeba zvláštní protokol pro měření kuliček na Luminexu.

### 3.3.6. Analýza dat v programu Match It! Antibody

Hodnoty MFI, od kterých je vzorek považován za pozitivní/negativní, jsou stejné jako u LABScreen Single Antigen pro I. i II. třídu. Za pozitivní je tedy považován vzorek při hodnotě MFI vyšší než 1000 u HLA antigenů I. třídy a vyšší než 2000 u HLA antigenů II. třídy.

Pozitivní kontrolní C3d kuličky slouží jako kontrola správného průběhu testu. Tyto kuličky slouží jako kontrola toho, že ke vzorkům bylo přidáno dostatečné množství fluorescenčně (PE) označených protilátek proti C3d, respektive toho, že tato součást celé soupravy nebyla nijak kontaminována. Pokud testování proběhlo v pořádku, hodnota MFI pozitivních kontrolních C3d kuliček je vyšší než 10000, což platí i u negativní kontroly. Fluorescence ostatních kuliček v negativní kontrole nesmí přesáhnout 500 MFI.

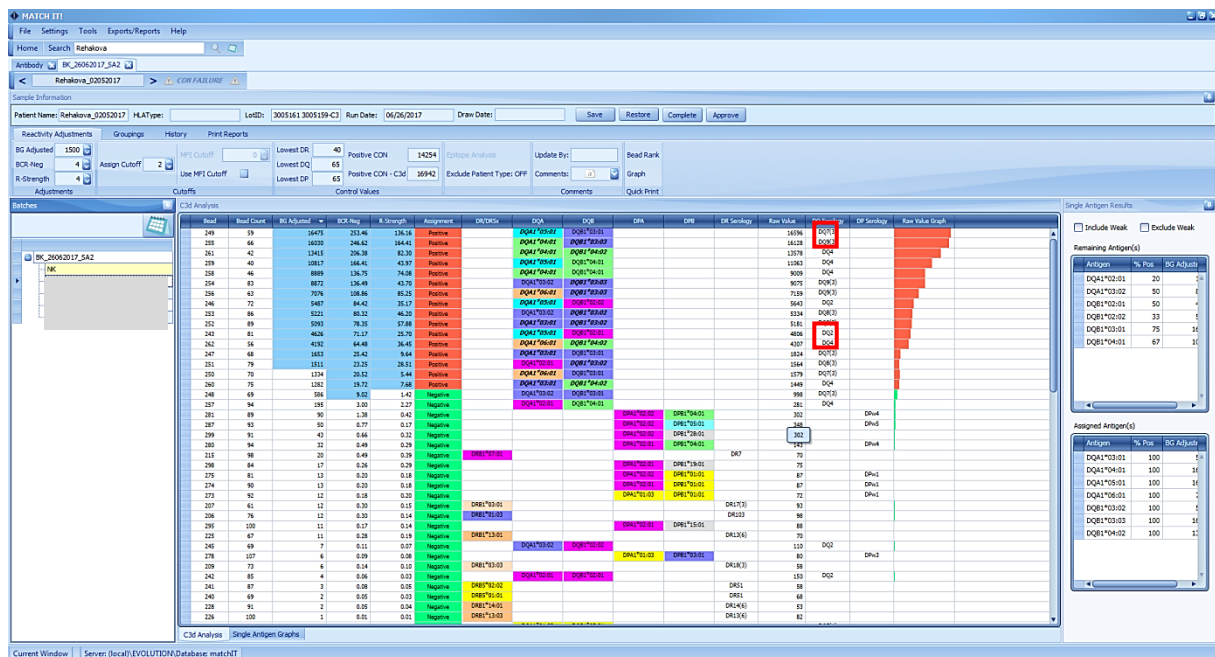
Aby bylo možno data z Luminexu analyzovat v programu Match It! Antibody, je zapotřebí mít v tomto programu nainstalovaný hodnotící protokol zvlášť pro každou šarži použitých kuliček.



Obrázek 10 Ukázka analýzy dat v programu Match It! Antibody – negativní kontrola

Pozitivní kontrolní kuličky = 11386 MFI

Pozitivní kontrolní C3d kuličky = 12159MFI



Obrázek 11 Ukázka analýzy dat v programu Match It! Antibody – pacient s pozitivním nálezem (protilátky proti II. třídě HLA)

Pozitivní kontrolní kuličky = 14254 MFI

Pozitivní kontrolní C3d kuličky = 16942 MFI

DSA = DQ7 = 5024 MFI (horní červený rámeček)

DSA = DQ8 = 4026 MFI (dolní červený rámeček)

## 4. Výsledky

Jak je uvedeno výše, v této práci prezentujeme data získaná ze souboru 124 pacientů, kteří podstoupili transplantaci jater v IKEM mezi lety 2015 až 2017.

U všech dárců a příjemců byl před transplantací proveden CDC test. Pouze u jednoho pacienta v souboru vyšel tento test jako pozitivní (tzn., u pacienta byly již před transplantací detekovány komplement-vážící protilátky).

U všech příjemců byly před transplantací určeny HLA antigeny I. a II. třídy – HLA-A, HLA-B a HLA-DR (na úrovni low-resolution). U dárců byly navíc určeny HLA-DQ.

Ze souboru 124 pacientů 94 podstoupilo protokolární biopsii během prvního roku po transplantaci. U těchto pacientů bylo možno porovnat jejich pooperační stav se specificitou protilátek a jejich schopností vázat nebo nevázat komplement. Celkem bylo testováno 358 sér.

### 4.1. Demografická data

Soubor pacientů se skládal z 68 mužů a z 56 žen. Věk pacientů se v okamžiku transplantace pohyboval mezi 1 až 73 roky, medián věku byl 59 let. Pacientům byla po transplantaci podávána standardní imunosupresiva, tzn. Tacrolimus (látko ze skupiny makrolidů, inhibitor kalcineurinu), kyselina mykofenolová (CellCept – antibiotikum) a kortikosteroidy. U souboru pacientů se celkový počet neshod v HLA antigenech mezi dárce a příjemcem pohyboval v rozmezí 0-6, medián hodnot byl 5. Dále byla stanovena hodnota PRA – panel reaktivních protilátek. Tato hodnota udává procento populace, proti kterému má daný pacient preformované protilátky. PRA se u souboru pacientů pohybovaly mezi 0 až 96, medián hodnot byl 0. V Tabulce 1 jsou uvedeny hodnoty PRA a HLA neshod, jsou rozděleny podle klinického stavu pacientů.

**Tabulka 1: Demografická data**

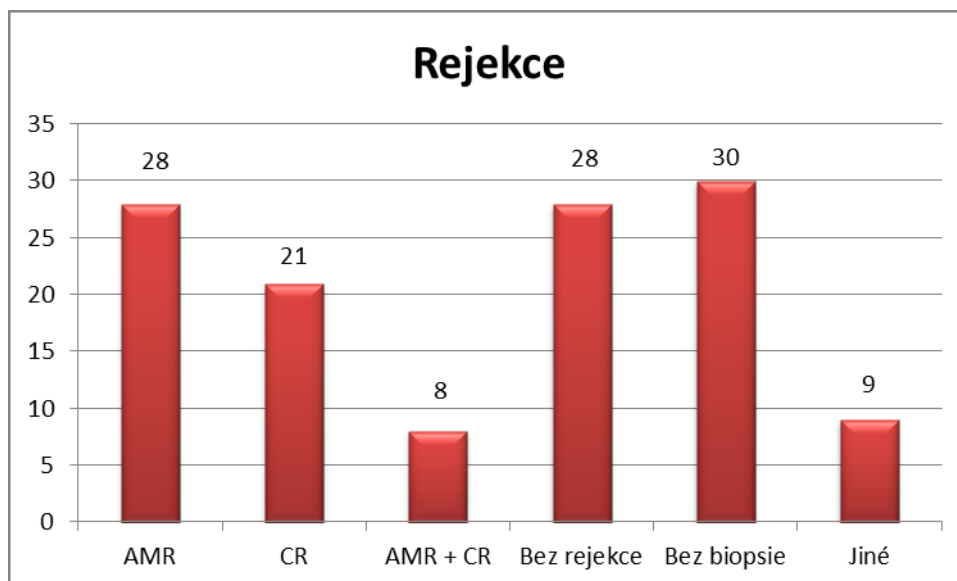
	AMR (n=28)	CR (n=21)	AMR + CR (n=8)	Bez rejekce (n=28)
Věk (roky)	61,5 (15 – 73)	58 (38 – 71)	58 (40 – 73)	50,5 (6 – 69)
PRA (>10%)	16 (57%)	18 (85%)	4 (50%)	19 (68%)
PRA (≤10%)	5 (18%)	2 (10%)	2 (25%)	4 (14%)
PRA (>50%)	1 (4%)	1 (5%)	2 (25%)	0 (0%)
PRA (≤50%)	2 (7%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (7%)
HLA neshody	5 (3 – 6)	5 (4 – 6)	5 (4 – 6)	5 (2 – 6)

\*Údaje o hladině PRA nebyly dostupné u všech pacientů

Většina pacientů v průběhu prvního roku po transplantaci podstoupila protokolární biopsii. Celkem u 28 pacientů byla diagnostikována AMR, u 21 pacientů celulární rejekce a u 8 pacientů byly určeny současně probíhající celulární rejekce i AMR. U 28 pacientů rejekce diagnostikována nebyla a u 6 pacientů došlo k rekurenci původního onemocnění (hepatitida typu C, CMV hepatitida). 30 pacientů biopsii nepodstoupilo.

Celkem u šesti pacientů došlo k selhání štěpu. U tří se jednalo o rejekci (u dvou o závažnou AMR, u jednoho o závažnou AMR a celulární rejekci současně). U zbývajících tří došlo k selhání štěpu v důsledku pooperačních komplikací, respektive vzniku trombu ve štěpu a jeho následné ischemii a nekróze.

Rejekce byla diagnostikována na základě Banffské klasifikace (viz kapitola „Diagnostika rejekce“).



**Graf 1 Výskyt různých typů rejekce u všech pacientů v souboru**

**\*Jiné – počet pacientů s neimunologickými komplikacemi. U 6 pacientů došlo k rekurenci původního onemocnění, u 3 došlo k selhání štěpu z neimunologických příčin**

#### 4.2. Stanovení hladiny protilátek a určení jejich specifity

Jak již bylo uvedeno, séra byla testována před transplantací, 3, 6 a 12 měsíců po transplantaci. Celkem bylo analyzováno 358 sér. Všechna séra byla vyšetřována pomocí LABScreen Mixed. Tento test je pouze orientační, zjišťuje pouze, zda jsou protilátky přítomny či ne. V případě zachycení protilátek byl vzorek dále testován pomocí soupravy LABScreen Single Antigen I. / II. Antibody Detection, aby bylo možné stanovit konkrétní specifitu protilátek. Vzorek byl dále testován pouze v případě, že hladina protilátek při použití LABScreen Mixed přesáhla 500 MFI v případě I. třídy HLA antigenů a 1000 MFI v případě II. třídy HLA antigenů.

Protilátky proti HLA antigenům byly detekovány u 52 pacientů. U 29 pacientů se jednalo o DSA, u 23 o non-DSA. Počty pacientů, u kterých byly tyto protilátky detekovány, jsou prezentovány v Tabulce 2.

**Tabulka 2: Protilátky proti HLA antigenům**

Typ protilátek	Preformované (n)			De novo (n)		
	I. třída	II. třída	Obě třídy	I. třída	II. třída	Obě třídy
DSA	8	5	6	4	4	2
Non-DSA	13	2	2	3	2	1
Negativní	71					

#### 4.3. Komplement-vážíci protilátky

Všech 52 pacientů, u kterých byly detekovány protilátky proti HLA antigenům, bylo dále testováno na přítomnost komplement-vážících protilátek pomocí C1q Screen a LIFECODES C3d Detection testů. Jak je uvedeno v kapitole „Cíle práce“, jedním z dílčích úkolů této práce bylo i porovnání těchto dvou souprav pro detekci komplement-vážících protilátek.

Komplement-vážíci protilátky byly detekovány celkem u 18 pacientů. U 17 pacientů se jednalo o C1q-vážíci protilátky, u 11 pacientů o C3d-vážíci protilátky. Celkové počty jsou uvedeny v Tabulce 3. U všech pacientů, u kterých byly detekovány C3d-vážíci protilátky, byly současně detekovány i C1q-vážíci protilátky. Jedinou výjimku tvořil pacient s *de novo* vytvořenými non-DSA, u kterého byly detekovány pouze C3d-vážíci protilátky.

Jeden pacient s *de novo* vytvořenými C1q-vážíci DSA neměl C3d-vážíci DSA; byly u něj detekovány pouze *de novo* vytvořené C3d-vážíci non-DSA.

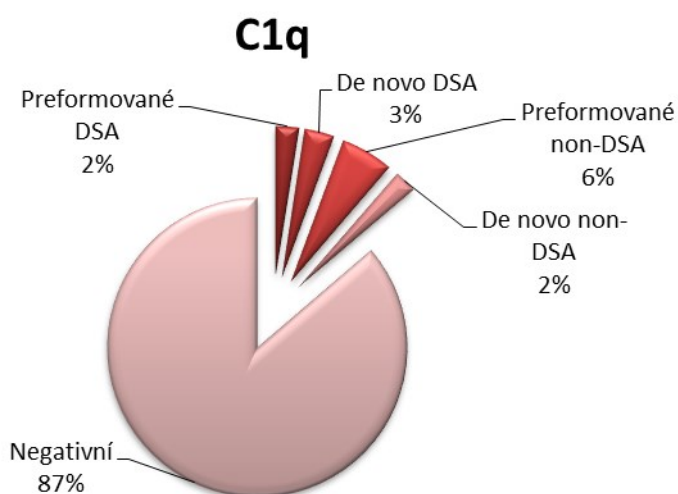
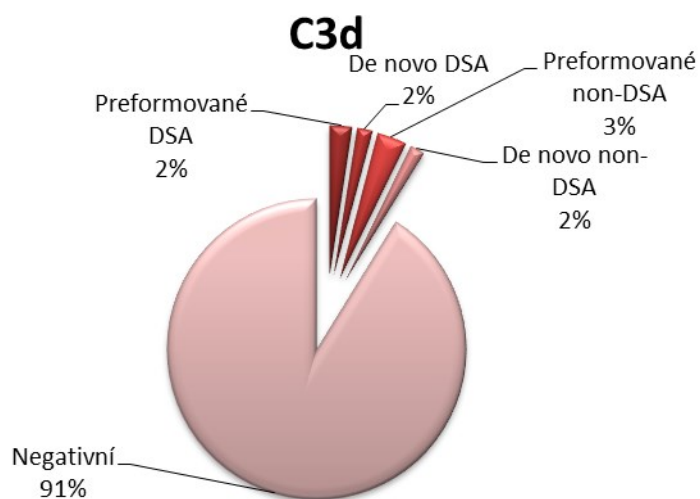
U jednoho pacienta s preformovanými komplement-vážíci DSA došlo pomocí C1q Screen k detekci DSA proti oběma třídám HLA antigenů. Pomocí LIFECODES C3d Detection testu byly detekovány pouze DSA proti HLA antigenům I. třídy.

V grafech 2 a 3 jsou porovnány celkové počty pacientů s C1q a C3d-vážíci protilátkami. Pacienti byli rozděleni do skupin jako v Tabulce 3. Rozdíly v počtu C1q+ a C3d+ pacientů se lišily o jednotky procent.



**Tabulka 3: Komplement-vážící protilátky**

Typ protilátek	DSA			Non-DSA			Negativní
	I. třída	II. třída	Obě třídy	I. třída	II. třída	Obě třídy	
C1q-vážící	7			10			107
- Preformované	2	0	1	4	3	0	
- <i>De novo</i> vytvořené	0	4	0	2	1	0	
C3d-vážící	5			6			113
- Preformované	3	0	0	2	2	0	
- <i>De novo</i> vytvořené	0	2	0	0	2	0	

**Graf 2 Pacienti s C1q-vážícími protilátkami****Graf 3 Pacienti s C3d-vážícími protilátkami**

Při porovnávání MFI hodnot komplement-vážících protilátek s MFI hodnotami komplement-nevážících protilátek se ukázala zajímavá korelace. Všechny komplement-vážící protilátky měly při testování pomocí soupravy LABScreen Single Antigen pro I. / II. třídu vysoké hodnoty MFI. U všech komplement-vážících protilátek tato hodnota přesahovala 6000 MFI. U komplement-vážících DSA byly hodnoty MFI ještě vyšší; žádná z identifikovaných komplement-vážících DSA neměla hodnotu fluorescence nižší než 9000 MFI. Tato korelace však neplatila absolutně, protože ne všechny protilátky s hodnotou MFI  $\geq 6000$  byly identifikovány jako komplement-vážící. Průměrné hodnoty MFI jsou prezentovány v Tabulce 4.

**Tabulka 4: Průměrné hodnoty MFI u komplement-vážících protilátek**

Typ protilátek	Specifická protilátek	Průměrná hodnota MFI*
DSA	HLA B	17483
	HLA DQ	16182
Non-DSA	HLA A	11224
	HLA B	9549
	HLA DQ	7541
	HLA DP	25380

\*Průměrná hodnota MFI pro jednotlivé HLA antigeny

#### 4.4. Porovnání hodnot MFI s klinickým stavem pacientů

V závěrečné fázi této práce došlo k porovnání naměřených hodnot MFI komplement-vážících protilátek proti HLA antigenům s klinickým stavem pacientů, respektive s tím, jestli u nich došlo k rejekci transplantovaných jater či nikoliv. Tyto údaje jsou prezentovány v Tabulce 5.

**Tabulka 5: Porovnání MFI hodnot komplement-vážících protilátek s klinickým stavem pacientů**

Typ protilátek	Počet pacientů (n)	Typ rejekce
DSA	7	
- Preformované	3 (3 C1q <sup>+</sup> i C3d <sup>+</sup> )	2 Selhání štěpu 1 Závažná AMR
- De novo	4 (2 C1q <sup>+</sup> i C3d <sup>+</sup> ; 2 C1q <sup>+</sup> )	2 Mírná AMR 1 Plasma-cell-rich rejection 1 Bez rejekce
Non-DSA	11	
- Preformované	7 (4 C1q <sup>+</sup> i C3d <sup>+</sup> ; 3 C1q <sup>+</sup> )	2 Závažná AMR 1 Celulární rejekce 2 Bez rejekce 2 Bez biopsie
- De novo	4 (3 C1q <sup>+</sup> ; 1 C3d <sup>+</sup> )	1 AMR + CR 3 Bez biopsie
Negativní	106	

Na základě získaných dat lze předpokládat, že by mohla existovat souvislost mezi výskytem komplement-vážících DSA a vývojem protilátkami-zprostředkované rejekce u pacientů po transplantaci jater. U všech pacientů, u kterých byly tyto protilátky detekovány, byla diagnostikována některá forma AMR. Jedinou výjimkou je pacient s *de novo* vytvořenými komplement-vážícími DSA, u kterého k vývoji rejekce nedošlo. Tento stav lze vysvětlit tím, že u tohoto pacienta byly komplement-vážící DSA detekovány až v séru odebraném až rok po transplantaci. Biopsie u tohoto pacienta proběhla dříve než odběr posledního séra.

Dále se lze domnívat, že preformované komplement-váží DSA mají horší vliv na klinický stav pacientů než ty *de novo* vytvořené. Všichni pacienti (3), u nichž byly detekovány preformované komplement-váží DSA, měli závažnější formu AMR, která u dvou z nich vedla až k selhání transplantovaného orgánu.

Souvislost mezi výskytem komplement-váží non-DSA a vývojem AMR nebo celulární rejekce bohužel nebylo u našeho souboru možné určit. 11 pacientů, u kterých byly tyto protilátky detekovány, mělo následující bioptické nálezy: u dvou pacientů došlo k vývoji AMR, u jednoho pacienta se vyvinula celulární rejekce, u jednoho pacienta došlo k vývoji AMR a celulární rejekce současně a u dvou pacientů k rejekce diagnostikována nebyla. U zbývajících pěti pacientů nebyly bioptické protokoly k dispozici.

## 5. Diskuse

Jak již bylo uvedeno, cílem této diplomové práce bylo určit klinický význam komplement-vážících protilátek proti HLA antigenům u pacientů po transplantaci jater a definovat, zda lze přítomnost těchto protilátek použít jako prediktivní marker vývoje protilátkami-zprostředkované rejekce. AMR je vážnou pooperační komplikací, která může vést k nevratnému poškození až selhání transplantovaného orgánu. Objevení nových prediktivních metod pro evaluaci rizika protilátkami zprostředkované rejekce patří mezi hlavní témata výzkumu jak klinických imunologů, tak imunologů, kteří se zabývají základním výzkumem transplantačních reakcí.

Na téma vlivu protilátek proti HLA antigenům na výsledek transplantace orgánů probíhá intenzivní výzkum již dlouho. Vliv těchto protilátek u transplantací jater byl však dlouhou dobu opomíjen. Názory na vliv těchto protilátek na klinický stav pacientů se po celou dobu značně lišily, jelikož játra jsou do určité míry rezistentní vůči protilátkami-zprostředkované rejekci. (Del Bello et al., 2016) Některé studie došly k závěru, že protilátky proti HLA antigenům, respektive DSA, nemají vliv na klinický stav pacientů po transplantaci jater (Taner et al., 2012). Jiné studie došly k přesně opačnému závěru, tedy že tyto protilátky na klinický stav pacientů značný vliv mají. (O'Leary et al., 2013)

V minulosti se pro detekci protilátek proti HLA antigenům užíval pouze CDC test, kterým lze detekovat pouze přítomnost komplement-vážících protilátek v séru pacientů. Později vyvinutá X-map technologie je prostřednictvím Luminexu schopná detekovat i mnohem nižší koncentrace protilátek než CDC test. Tato technologie detekuje hladiny IgG protilátek bez ohledu na to, jestli váží komplement nebo ne. (Ducreux et al., 2016) Podle údajů v dostupné není literatuře standardní testování na přítomnost protilátek proti HLA antigenům pro určení rizika vývoje AMR dostatečně relevantní. (O'Leary et al., 2015)

Pomocí C1qScreen nebo LIFECODES C3d Detection testu je možné protilátky rozlišit na komplement-vážíci a komplement-nevážíci. Jak mimo jiné vychází i z výše citované studie O'Learyho a kol., 2015, test na výskyt komplement-vážících protilátek v krvi pacientů má vyšší vypovídající hodnotu, než standardní test na přítomnost protilátek proti HLA antigenům, který jejich schopnost vázat komplement nerozlišuje. (O'Leary et al., 2015)

Jak již bylo uvedeno výše, naše studie proběhla celkem na 124 pacientech. Protilátky proti HLA antigenům byly detekovány u 52, tedy 64% z celkového počtu pacientů. Z uvedených 52 pacientů se u 29 z nich jednalo o DSA a u zbylých 23 o non-DSA. Těchto 52 pacientů bylo dále testováno na přítomnost komplement-vážících protilátek. U 18 z uvedených 52 pacientů, tedy u 22% z celkového počtu pacientů, byly detekovány komplement-vážící protilátky proti HLA antigenům. U 7 z těchto 18 pacientů se jednalo o DSA, u zbylých 11 o non-DSA.

Všichni pacienti, u kterých byly detekovány komplement-vážící DSA, prodělali některou z forem AMR. Jedinou výjimkou byl pacient, u kterého proběhl odběr séra, v němž byly tyto protilátky detekovány až po průběhu biopsie. Ze získaných dat lze tedy vyvozovat, že existuje souvislost mezi výskytem komplement-vážících DSA a vznikem AMR u pacientů po transplantaci jater.

Rovněž se ukázalo, že preformované komplement-vážící DSA mají horší vliv na klinický stav pacientů než ty *de novo* vytvořené. Preformované komplement-vážící DSA byly detekovány celkem u tří pacientů, přičemž u všech došlo k vývoji závažné AMR, která u dvou pacientů vedla k selhání transplantovaného orgánu v horizontu několika dní po transplantaci. Tři ze čtyř pacientů, u kterých byly detekovány *de novo* vytvořené komplement-vážící DSA, také prodělali AMR, nicméně v tomto případě se u žádného z nich nejednalo o závažnou formu AMR. U dvou pacientů se jednalo o mírnou formu AMR, u třetího pacienta došlo k vývoji tzv. „plasma-cell-rich rejection“.

Na základě získaných dat lze také říci následující: má klinický význam detekovat přítomnost komplement-vážících DSA nejen před transplantací, ale i po ní. K tomuto závěru jsme dospěli, jelikož, jak bylo uvedeno, i přítomnost *de novo* vytvořených DSA má negativní vliv na přežívání transplantovaného štěpu.

Získaná data se shodují nejen se závěry výše citované studie O'Learyho a kol, 2015, ale také se studiemi Wozniaka a kol., 2015 a Kozłowského a kol., 2017, které rovněž potvrzují negativní vliv komplement-vážících DSA na klinický stav pacientů po transplantaci jater.

Dále bylo zjištěno, že všechny komplement-vážící DSA měly při testování pomocí soupravy LABScreen Single Antigen pro I. / II. třídu vysoké hodnoty MFI. Fluorescence u žádné z těchto protilátek nebyla nižší než 9000 MFI. Nepříznivý vliv DSA s vysokými hodnotami MFI na klinický stav pacientů je popsán i ve studii Grabhorna a kol., 2015. Studie Tokodae a kol., 2017 uvádí, že vysoké procento (konkrétně 87%) protilátek s vysokými hodnotami MFI je komplement-vážících. Obě uvedené studie definují jako „vysoké hodnoty“ MFI  $\geq 5000$ .

V případě komplement-vážících non-DSA se získané poznatky značně liší. Ze sedmi pacientů, u nichž byly detekovány preformované komplement-vážící non-DSA, byla u dvou pacientů diagnostikována závažná AMR, u jednoho pacienta došlo k vývoji celulární rejekce a u dvou k rejekce diagnostikována nebyla. U zbylých dvou pacientů nebyly bioptické protokoly k dispozici. Ze tří pacientů, u kterých byly detekovány *de novo* vytvořené komplement-vážící non-DSA, jsou výsledky biopsie dostupné pouze v jediném případě. U tohoto pacienta došlo k vývoji AMR i celulární rejekce současně.

Na základě uvedených hodnot nebylo možné se jednoznačně vyjádřit ke klinickému významu komplement-vážících non-DSA.

U dvou pacientů, u kterých došlo k vývoji AMR, byly detekovány pouze C1q-vážící protilátky (C3d test byl negativní). U prvního pacienta byly pouze C1q-vážící *de novo* vytvořené DSA. Pacient měl diagnostikovanou „plasma-cell-rich rejection“ a druhý pacient měl závažnou AMR (C1q-vážící preformované non-DSA). U dalšího pacienta byly určeny *de novo* vytvořené C1q-vážící DSA, současně byly detekovány pouze *de novo* vytvořené C3d-vážící non-DSA. U tohoto pacienta byla diagnostikována mírná AMR. Nelze vyloučit, že tento nález byl ovlivněn efektem prozóny. Jak bylo již výše zmíněno, tento efekt, tedy tvorba imunokomplexů za přítomnosti C1q podjednotky komplementu, může způsobit, že detekované hladiny protilátek ve vzorcích mohou být nižší, než ve skutečnosti. (Anani et al., 2016) V pracovním postupu pro LIFECODES C3d Detection testu nedochází k eliminaci C1q

podjednotky před vazbou protilátek na kuličky. Bylo by tudíž vhodné tento krok přidat a zabránit tak možnosti vzniku efektu prozóny (tepelná inaktivace komplementu v první fázi testu).

Pro shrnutí dat získaných v této studii lze uvést, že se dá předpokládat souvislost mezi přítomností komplement-vážících DSA v séru a vývojem protilátkami-zprostředkované rejekce u pacientů po transplantaci jater. Tyto výsledky by měly být potvrzeny na větším souboru pacientů, eventuálně by bylo vhodné provést multicentrická studia. Diagnostika komplement-vážících DSA má pravděpodobně klinickou relevanci a možná by se mohla používat jako prediktivní marker vývoje protilátkami zprostředkované rejekce u pacientů po transplantaci jater.



## 6. Závěry

Tato diplomová práce byla zaměřena na studium klinického významu komplement-vážících protilátek proti HLA antigenům u pacientů po transplantaci jater.

1. U všech pacientů s preformovanými komplement-vážícími donor-specifickými protilátkami došlo po transplantaci k vývoji těžké formy protilátkami-zprostředkované rejekce.
2. U tří pacientů ze čtyř, kteří produkovali *de novo* komplement-vážící donor-specifické protilátky, se vyvinula protilátkami-zprostředkovaná rejekce.
3. Definice donor-specifických protilátek z hlediska komplement-vážící aktivity by mohla poskytnout relevantní informace o riziku vývoje AMR po transplantaci jater.
4. Lze se domnívat, že případě preformovaných komplement-vážících DSA by mohlo být vyšší riziko vzniku závažnějších forem AMR než u *de novo* vytvořených. Tyto výsledky by měly být potvrzeny na větším souboru pacientů.
5. Všechny komplement-vážící protilátky detekované u našeho souboru pacientů měly vysoké hodnoty MFI. U všech komplement-vážících protilátek byly tyto hodnoty vyšší, než 6000 MFI. V případě komplement-vážících DSA byly tyto hodnoty vyšší než 9000 MFI.

Na základě našich výsledků lze vyvodit následující doporučení pro praxi:

- Lze doporučit detekci komplement-vážících DSA před a po transplantaci jater z hlediska možné predikce vývoje AMR.

## 7. Seznam použité literatury

Abdel-Misih, S.R.Z., and Bloomston, M. (2010). Liver Anatomy. *Surg. Clin.* 90, 643–653.

Adeva-Andany, M.M., Pérez-Felpete, N., Fernández-Fernández, C., Donapetry-García, C., and Pazos-García, C. (2016). Liver glucose metabolism in humans. *Biosci. Rep.* 36, 167-179.

Akdur, A., Kirnap, M., Ozcay, F., Sezgin, A., Ayvazoglu, H.S., Karakayali, F.Y., Yildirim, S., Moray, G., Arslan, G., and Haberal, M. (2015). Large-for-size liver transplant: a single-center experience. *Exp. Clin. Transplant. Off. J. Middle East Soc. Organ Transplant.* 13 *Suppl 1*, 108–110.

Althaf, M.M., El Kossi, M., Jin, J.K., Sharma, A., and Halawa, A.M. (2017). Human leukocyte antigen typing and crossmatch: A comprehensive review. *World J. Transplant.* 7, 339–348.

Anani, W.Q., Zeevi, A., and Lunz, J.G. (2016). EDTA Treatment of Serum Unmasks Complement-Mediated Prozone Inhibition in Human Leukocyte Antigen Antibody Testing. *Am. J. Clin. Pathol.* 146, 346–352.

Bogdanos, D.P., Gao, B., and Gershwin, M.E. (2013). Liver Immunology. *Compr. Physiol.* 3, 567–598.

Campagne, M.V.L., Wiesmann, C., and Brown, E.J. (2007). Macrophage complement receptors and pathogen clearance. *Cell. Microbiol.* 9, 2095–2102.

Cohen, D., Colvin, R.B., Daha, M.R., Drachenberg, C.B., Haas, M., Nickeleit, V., Salmon, J.E., Sis, B., Zhao, M.-H., Bruijn, J.A., et al. (2012). Pros and cons for C4d as a biomarker. *Kidney Int.* 81, 628–639.

Comoli, P., Cioni, M., Tagliamacco, A., Quartuccio, G., Innocente, A., Fontana, I., Trivelli, A., Magnasco, A., Nocco, A., Klersy, C., et al. (2016). Acquisition of C3d-Binding Activity by De Novo Donor-Specific HLA Antibodies Correlates With Graft Loss in Nonsensitized Pediatric Kidney Recipients. *Am. J. Transplant.* 16, 2106–2116.

Couchonnal, E., Rivet, C., Ducreux, S., Dumortier, J., Bosch, A., Boillot, O., Collardeau-Frachon, S., Dubois, R., Hervieu, V., André, P., et al. (2017). Deleterious impact of C3d-binding donor-specific anti-HLA antibodies after pediatric liver transplantation. *Transpl. Immunol.* 45, 8–14.

Cozzi, E., Colpo, A., and Silvestro, G.D. (2017). The mechanisms of rejection in solid organ transplantation. *Transfus. Apher. Sci.* 56, 498–505.

Del Bello, A., Congy-Jolivet, N., Danjoux, M., Muscari, F., and Kamar, N. (2016). Donor-specific antibodies and liver transplantation. *Hum. Immunol.* 77, 1063–1070.

Demetris, A.J., Zeevi, A., and O’Leary, J.G. (2015). ABO-compatible Liver Allograft Antibody-mediated Rejection: an update. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 20, 314–324.

Demetris, A.J., Bellamy, C., Hübscher, S.G., O’Leary, J., Randhawa, P.S., Feng, S., Neil, D., Colvin, R.B., McCaughan, G., Fung, J.J., et al. (2016). 2016 Comprehensive Update of the Banff Working Group on Liver Allograft Pathology: Introduction of Antibody-Mediated Rejection. *Am. J. Transplant.* 16, 2816–2835.

Demetris, A.J., Bellamy, C.O.C., Gandhi, C.R., Prost, S., Nakanuma, Y., and Stolz, D.B. (2016) Functional Immune Anatomy of the Liver—As an Allograft. *Am. J. Transplant.* 16, 1653–1680.

DeWolf, S., and Sykes, M. (2017). Alloimmune T cells in transplantation. *J. Clin. Invest.* 127, 2473–2481.

Dhainaut, J.-F., Marin, N., Mignon, A., and Vinsonneau, C. (2001). Hepatic response to sepsis: Interaction between coagulation and inflammatory processes. *Crit. Care Med.* 29, S42–S47.

Ducreux, S., Guillaud, O., Bosch, A., Thaumat, O., Morelon, E., Hervieu, V., Mekki, Y., Boillot, O., Scoazec, J.-Y., Dubois, V., et al. (2016). Monitoring efficiency of humoral rejection episode therapy in liver transplantation: any role for complement binding Luminex Single Antigen assays? *Transpl. Immunol.* 35, 23–28.

Dugué-Pujol, S., Rousset, X., Pastier, D., Quang, N.T., Pautre, V., Chambaz, J., Chabert, M., and Kalopissis, A.-D. (2006). Human apolipoprotein A-II associates with

triglyceride-rich lipoproteins in plasma and impairs their catabolism. *J. Lipid Res.* 47, 2631–2639.

Fahrner, R., Dondorf, F., Ardelt, M., Settmacher, U., and Rauchfuss, F. (2016). Role of NK, NKT cells and macrophages in liver transplantation. *World J. Gastroenterol.* 22, 6135–6144.

Firl, D.J., Benichou, G., Kim, J.I., and Yeh, H. (2017). A Paradigm Shift on the Question of B Cells in Transplantation? Recent Insights on Regulating the Alloresponse. *Front. Immunol.* 8, 80.

Ford, M.L., Adams, A.B., and Pearson, T.C. (2014). Targeting co-stimulatory pathways: transplantation and autoimmunity. *Nat. Rev. Nephrol.* 10, 14–24.

Geneugelijk, K., Thus, K.A., and Spierings, E. (2014). Predicting Alloreactivity in Transplantation, *Journal of immunological research* 21.

Goldberg, D., Ditah, I.C., Saeian, K., Lalehzari, M., Aronsohn, A., Gorospe, E.C., and Charlton, M. (2017). Changes in the Prevalence of Hepatitis C Virus Infection, Nonalcoholic Steatohepatitis, and Alcoholic Liver Disease Among Patients With Cirrhosis or Liver Failure on the Waitlist for Liver Transplantation. *Gastroenterology* 152, 1090–1099.

Grabhorn, E., Binder, T.M.C., Obrecht, D., Brinkert, F., Lehnhardt, A., Herden, U., Peine, S., Nashan, B., Ganschow, R., and Briem-Richter, A. (2015). Long-term Clinical Relevance of De Novo Donor-Specific Antibodies After Pediatric Liver Transplantation. *Transplantation* 99, 1876–1881.

Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Théry, C., and Amigorena, S. (2002). Antigen Presentation and T Cell Stimulation by Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 621–667.

Haas, M., Sis, B., Racusen, L.C., Solez, K., Glotz, D., Colvin, R.B., Castro, M.C.R., David, D.S.R., David-Neto, E., Bagnasco, S.M., et al. (2014). Banff 2013 Meeting Report: Inclusion of C4d-Negative Antibody-Mediated Rejection and Antibody-Associated Arterial Lesions. *Am. J. Transplant.* 2, 272–283.

Hamoud, A.-R., Weaver, L., Stec, D.E., and Hinds, T.D. (2018). Bilirubin in the Liver–Gut Signaling Axis. *Trends Endocrinol. Metab.* 29, 140–150.

Harmon, C., Sanchez-Fueyo, A., O’Farrelly, C., and Houlihan, D.D. (2016) Natural Killer Cells and Liver Transplantation: Orchestrators of Rejection or Tolerance? *Am. J. Transplant.* 16, 751–757.

Ingulli, E. (2010). Mechanism of cellular rejection in transplantation. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* 25, 61–74.

Júnior, M., Ferreira, R., Salvalaggio, P., Rezende, M.B. de, Evangelista, A.S., Guardia, B.D., Matielo, C.E.L., Neves, D.B., Pandullo, F.L., Felga, G.E.G., et al. (2015). Liver transplantation: history, outcomes and perspectives. *Einstein São Paulo* 13, 149–152.

van Kasteren, S.I., Overkleeft, H., Ovaa, H., and Neefjes, J. (2014). Chemical biology of antigen presentation by MHC molecules. *Curr. Opin. Immunol.* 26, 21–31.

Kim, J.J., Shaw, O., Martin, C., Michaelides, G., Balasubramaniam, R., Sebire, N.J., Mamode, N., Dorling, A., Vaughan, R., and Marks, S.D. (2018). Clinical risk stratification of paediatric renal transplant recipients using C1q and C3d fixing of de novo donor-specific antibodies. *Pediatr. Nephrol.* 33, 167–174.

Klein, J., and Sato, A. (2000a). The HLA System. *N. Engl. J. Med.* 343, 702–709.

Klein, J., and Sato, A. (2000b). The HLA System. *N. Engl. J. Med.* 343, 782–786.

Kozłowski, T., Weimer, E.T., Andreoni, K., and Schmitz, J. (2017). C1q test for identification of sensitized liver recipients at risk of early acute antibody-mediated rejection. *Ann. Transplant.* 22, 518–523.

Kunutsor, S.K., Apekey, T.A., Seddoh, D., and Walley, J. (2014). Liver enzymes and risk of all-cause mortality in general populations: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Epidemiol.* 43, 187–201.

Laurence, J.M., Sapisochin, G., DeAngelis, M., Seal, J.B., Miserachs, M.M., Marquez, M., Zair, M., Fecteau, A., Jones, N., Hrycko, A., et al. (2015) Biliary complications in pediatric liver transplantation: Incidence and management over a decade. *Liver Transpl.* 21, 1082–1090.

Lefaucheur, C., Viglietti, D., Bentelejewski, C., Huyen, J.-P.D. van, Vernerey, D., Aubert, O., Verine, J., Jouven, X., Legendre, C., Glotz, D., et al. (2016). IgG Donor-Specific Anti-Human HLA Antibody Subclasses and Kidney Allograft Antibody-Mediated Injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 27, 293–304.

Levine, M.H., and Abt, P.L. (2012). Treatment Options and Strategies for Antibody Mediated Rejection after Renal Transplantation. *Semin. Immunol.* 24, 136–142.

Libby, P., and Pober, J.S. (2001). Chronic Rejection. *Immunity* 14, 387–397.

Liu, H., Li, R., Fu, J., He, Q., and Li, J. (2016). Technical Skills Required in Split Liver Transplantation. *Ann. Transplant.* 21, 408–415.

Loupy, A., Lefaucheur, C., Vernerey, D., Prugger, C., van Huyen, J.-P.D., Mooney, N., Suberbielle, C., Frémeaux-Bacchi, V., Méjean, A., Desgrandchamps, F., et al. (2013). Complement-Binding Anti-HLA Antibodies and Kidney-Allograft Survival. *N. Engl. J. Med.* 369, 1215–1226.

Luo, H.-Y., Ma, S.-F., Qu, J.-F., and Tian, D.-H. (2015). Effects of Kupffer cell inactivation on graft survival and liver regeneration after partial liver transplantation in rats. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* 1, 56–62.

Luo, L., Li, Z., Wu, W., Luo, G., Mei, H., Sun, Z., and Xu, C. (2013). The effect of MICA antigens on kidney transplantation outcomes. *Immunol. Lett.* 156, 54–58.

Moussaoui, D., Toso, C., Nowacka, A., McLin, V.A., Bednarkiewicz, M., Andres, A., Berney, T., Majno, P., and Wildhaber, B.E. (2017) Early complications after liver transplantation in children and adults: Are split grafts equal to each other and equal to whole livers? *Pediatr. Transplant.* 21, e12908.

Muczynski, K.A., Ekle, D.M., Coder, D.M., and Anderson, S.K. (2003). Normal Human Kidney HLA-DR–Expressing Renal Microvascular Endothelial Cells: Characterization, Isolation, and Regulation of MHC Class II Expression. *J. Am. Soc. Nephrol.* *14*, 1336–1348.

O’Leary, J.G., Kaneku, H., Jennings, L.W., Bañuelos, N., Susskind, B.M., Terasaki, P.I., and Klintmalm, G.B. (2013) Preformed class II donor-specific antibodies are associated with an increased risk of early rejection after liver transplantation. *Liver Transpl.* *19*, 973–980.

O’Leary, J.G., Kaneku, H., Banuelos, N., Jennings, L.W., Klintmalm, G.B., and Terasaki, P.I. (2015) Impact of IgG3 Subclass and C1q-Fixing Donor-Specific HLA Alloantibodies on Rejection and Survival in Liver Transplantation. *Am. J. Transplant.* *15*, 1003–1013.

Pieper, K., Grimbacher, B., and Eibel, H. (2013). B-cell biology and development. *J. Allergy Clin. Immunol.* *131*, 959–971.

Reed, E.F., Demetris, A.J., Hammond, E., Itescu, S., Kobashigawa, J.A., Reinsmoen, N.L., Rodriguez, E.R., Rose, M., Stewart, S., Suciu-Foca, N., et al. (2006). Acute Antibody-mediated Rejection of Cardiac Transplants. *J. Heart Lung Transplant.* *25*, 153–159.

Rezvani, R., Smith, J., Lapointe, M., Marceau, P., Tchernof, A., and Cianflone, K. (2014). Complement Receptors C5aR and C5L2 Are Associated with Metabolic Profile, Sex Hormones, and Liver Enzymes in Obese Women Pre- and Postbariatric Surgery, *Journal of obesity* *2014*.

Roden, A.C., Aisner, D.L., Allen, T.C., Aubry, M.C., Barrios, R.J., Beasley, M.B., Cagle, P.T., Capelozzi, V.L., Dacic, S., Ge, Y., et al. (2016). Diagnosis of Acute Cellular Rejection and Antibody-Mediated Rejection on Lung Transplant Biopsies: A Perspective From Members of the Pulmonary Pathology Society. *Arch. Pathol. Lab. Med.* *141*, 437–444.

Rodgers, J.R., and Cook, R.G. (2005). MHC class Ib molecules bridge innate and acquired immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 459–471.

Ruot, B., Breuillé, D., Rambourdin, F., Bayle, G., Capitan, P., and Obled, C. (2000). Synthesis rate of plasma albumin is a good indicator of liver albumin synthesis in sepsis. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 279, E244–E251.

Shoreem, H., Gad, E.H., Soliman, H., Hegazy, O., Saleh, S., Zakaria, H., Ayoub, E., Kamel, Y., Abouelella, K., Ibrahim, T., et al. (2017). Small for size syndrome difficult dilemma: Lessons from 10 years single centre experience in living donor liver transplantation. *World J. Hepatol.* 9, 930–944.

Sicard, A., Ducreux, S., Rabeyrin, M., Couzi, L., McGregor, B., Badet, L., Scoazec, J.Y., Bachelet, T., Lepreux, S., Visentin, J., et al. (2014). Detection of C3d-Binding Donor-Specific Anti-HLA Antibodies at Diagnosis of Humoral Rejection Predicts Renal Graft Loss. *J. Am. Soc. Nephrol.* 26, 457–467.

Stites, E., Quintrec, M.L., and Thurman, J.M. (2015). The Complement System and Antibody-Mediated Transplant Rejection. *J. Immunol.* 195, 5525–5531.

Tacke, F. (2018). New Insights on the Role of Kupffer Cells in Liver Transplantation. *Transplantation* 102, 896–897.

Tait, B.D., Süsal, C., Gebel, H.M., Nickerson, P.W., Zachary, A.A., Claas, F.H.J., Reed, E.F., Bray, R.A., Campbell, P., Chapman, J.R., et al. (2013). Consensus Guidelines on the Testing and Clinical Management Issues Associated With HLA and Non-HLA Antibodies in Transplantation. *Transplantation* 95, 19–47.

Taner, T., Gandhi, M.J., Sanderson, S.O., Poterucha, C.R., Goey, S.R.D., Stegall, M.D., and Heimbach, J.K. (2012) Prevalence, Course and Impact of HLA Donor-Specific Antibodies in Liver Transplantation in the First Year. *Am. J. Transplant.* 12, 1504–1510.

Tokodai, K., Miyagi, S., Nakanishi, C., Hara, Y., Nakanishi, W., Goto, M., Unno, M., and Kamei, T. (2017). Impact of the Trough Level of Calcineurin Inhibitor on the Prevalence of Donor-Specific Human Leukocyte Antigen Antibodies During Long-Term Follow-Up After Pediatric Liver Transplantation: Antibody Strength and Complement-Binding Ability. *Transplant.* 3, e196.



- Valenzuela, N.M., and Reed, E.F. (2017). Antibody-mediated rejection across solid organ transplants: manifestations, mechanisms, and therapies. *J. Clin. Invest.* 127, 2492–2504.
- Vlaminck, H., Maes, B., Evers, G., Verbeke, G., Lerut, E., Damme, B.V., and Vanrenterghem, Y. (2004). Prospective Study on Late Consequences of Subclinical Non-Compliance with Immunosuppressive Therapy in Renal Transplant Patients. *Am. J. Transplant.* 4, 1509–1513.
- Walport, M.J. (2001a). Complement. *N. Engl. J. Med.* 344, 1058–1066.
- Walport, M.J. (2001b). Complement. *N. Engl. J. Med.* 344, 1140–1144.
- Wan, P., Li, Q., Zhang, J., and Xia, Q. (2015) Right lobe split liver transplantation versus whole liver transplantation in adult recipients: A systematic review and meta-analysis. *Liver Transpl.* 21, 928–943.
- Wozniak, L.J., Hickey, M.J., Venick, R.S., Vargas, J.H., Farmer, D.G., Busuttil, R.W., McDiarmid, S.V., and Reed, E.F. (2015). Donor-specific HLA antibodies are associated with late allograft dysfunction after pediatric liver transplantation. *Transplantation* 99, 1416–1422.
- Wozniak, L.J., Naini, B.V., Hickey, M.J., Bhattacharyya, S., Reed, E.F., Busuttil, R.W., Farmer, D.G., Vargas, J.H., Venick, R.S., and McDiarmid, S.V. (2017). Acute antibody-mediated rejection in ABO-compatible pediatric liver transplant recipients: case series and review of the literature. *Pediatr. Transplant.* 21, e12791.
- Yell, M., Muth, B.L., Kaufman, D.B., Djamali, A., and Ellis, T.M. (2015). C1q Binding Activity of De Novo Donor-specific HLA Antibodies in Renal Transplant Recipients With and Without Antibody-mediated Rejection. *Transplantation* 99, 1151–1155.
- Zahavi, D., AlDeghaither, D., O’Connell, A., and Weiner, L.M. (2018) Enhancing Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity (ADCC): A Strategy for Improving Antibody-based Immunotherapy. *Antib. Ther* 2.

Zhao, Z., Pan, G., Tang, C., Li, Z., Zheng, D., Wei, X., and Wu, Z. (2018). IL-34 Inhibits Acute Rejection of Rat Liver Transplantation by Inducing Kupffer Cell M2 Polarization. *Transplantation* 102, e265–274.

## 8. Přílohy

### ANTIBODY-MEDIATED REJECTION AFTER LIVER TRANSPLANTATION - RELEVANCE OF C1q AND C3d-BINDING ANTIBODIES

Barbora Kovandova<sup>1</sup>, Antonij Slavcev<sup>1</sup>, Zuzana Sekerkova<sup>1</sup>, Eva Honsova<sup>2</sup>, Pavel Trunecka<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunogenetics, <sup>2</sup>Department of Clinical & Transplantation Pathology,

<sup>3</sup>Clinic of Hepatology, IKEM, Prague, CZECH REPUBLIC

**CORRESPONDING AUTHOR:** Dr. Antonij Slavcev, Department of Immunogenetics, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Videnska 1958/9, Prague 140 21, Czech Republic

Phone: +420-26136 2347

Fax: +420-26136 2393

E-mail: [antonij.slavcev@ikem.cz](mailto:antonij.slavcev@ikem.cz)

**Conflict of Interest:** [All authors declare no conflict of interest in this study.](#)

**RUNNING TITLE:** Antibody-mediated rejection of the transplanted liver

#### Abbreviations

AMR	antibody-mediated rejection
ACR	acute cellular rejection
DSA	donor-specific antibodies
HLA	human leukocyte antigens
SA	single antigen

**Author contributions:**

Barbora Kovandova: performed experiments, analysed data, wrote the article

Antonij Slavcev: contributed to the study design, analysed data, wrote the article

Zuzana Sekerkova: performed experiments, analysed data

Eva Honsova: analysed liver allograft biopsies, revised the article

Pavel Trunecka: analyzed clinical data, revised the article

**Abstract**

The aim of our study was to evaluate the relevance of complement-binding donor-specific antibodies (DSA) for prediction of antibody-mediated rejection after liver transplantation. Sera from 123 liver transplant recipients were retrospectively defined for HLA specificity and complement-fixing activity using the single antigen beads, C1q and C3d techniques. Liver-recipients' sera were tested before transplantation, 3, 6 months and one year after transplantation. Patients were followed up for graft survival and rejection incidence for one year after transplantation. All patients with pre-transplant complement-binding DSA developed severe antibody-mediated rejection after transplantation, while three recipients out of four, who produced de novo complement-fixing DSA, developed AMR. Definition of DSA with respect to complement-fixing activity may provide clinically relevant information about the risk of antibody-mediated rejection after liver transplantation

**Keywords:** liver transplantation, antibodies, complement, C4d, rejection, HLA, crossmatch

Acute antibody-mediated rejection (AMR) after liver transplantation is rare, however, there is increasing awareness that AMR may cause deterioration of graft function and impaired survival of transplanted organs (1) (2) (3). Due to the complex pathological characteristics which may overlap with other non-immunological complications, like biliary obstruction, ischemic injury and others, the diagnosis of AMR after liver transplantation is difficult (4). The transplanted liver has tolerogenic (immunosuppressive) properties and is relatively resistant to the harmful effects of donor-specific antibodies (DSA), because of the large absorbing surface of the organ, clearance of immune complexes by Kupffer cells, and various other (probably also unknown) factors (5). Quite a few studies have already indicated worse graft and patient survival in recipients with persistent DSA and *de novo*-produced DSA (6) (7) (8) (9) (10). On the other hand, data on the role of complement-binding DSA in comparison with non-complement fixing DSA in the assessment of the risk for liver transplant rejection remain still limited (11). The goal of our retrospective study was therefore to evaluate the clinical relevance of complement-binding donor-specific antibodies (as defined by the single-antigen bead techniques) for prediction of the risk of antibody-mediated rejection after liver transplantation.

One hundred twenty three liver recipients transplanted in our centre between the years 2015 and 2017 were included into the study. All patients received grafts from deceased donors. Recipients were followed for allograft function, incidence of rejection and graft survival for up to 1 year after transplantation. The research was approved by the ethics committee of the institute and written informed consent was obtained from all patients. The demographic characteristics of patients with biopsy-proven rejection in comparison with patients without rejection are shown in Table 1. Liver recipients were HLA typed by the PCR SSOP technique (intermediate resolution) for HLA-A, -B and -DR loci (OneLambda, Canoga Park, USA). Organ donors were HLA typed by PCR SSP low resolution kits (Olerup and BAG) for HLA-A, -B, -DR and -DQ loci. No allele-specific antibodies or antibodies solely to the DQ-alpha chain were detected, so high-resolution typing was not necessary.

Detection and specification of antibodies were performed before, 3, 6 and 12 months after transplantation. For elimination of the prozone effect, all sera were pre-treated with EDTA. One recipient had a positive complement-dependent cytotoxicity (CDC) crossmatch test before transplantation, all remaining patients had negative CDC crossmatch test. No unacceptable HLA antigens were defined in the liver graft allocation process. During the one year follow up 6 grafts failed, 3 livers were lost due to immunologic complications, and three due to other reasons (thrombosis and subsequent graft ischemia). Pre- and post-transplantation sera were analysed retrospectively using the Luminex technique. In total, 355 serum samples were tested. Detection of HLA antibodies was performed using the

LABScreen Mixed technique; positive sera were then screened for HLA specificity using single antigen (SA) beads (One Lambda Inc., Canoga Park, USA) according to the manufacturer's instructions. A cut-off for positivity of 1000 MFI and 2000 MFI which was previously validated by the laboratory was applied for class I and class II SA beads, respectively. Further, positive sera were tested for complement-binding activity by the C1q Screen (OneLambda) and Lifecodes C3d Detection kits (Immucor, Stamford, USA). Donor-specific antibodies were defined against HLA-A, -B and -DR and -DQ antigens.

Cellular (CR) and antibody-mediated rejection (AMR) were diagnosed in graft biopsies according to the criteria of the updated Banff classification published recently (4). The diagnosis of AMR was supported by immunofluorescent detection of diffuse C4d deposits (> 10%) and the simultaneous presence of DSA. The standard immunosuppressive protocol after transplantation included calcineurin inhibitors, mycophenolate mofetil and corticosteroids.

Our analysis had two parts. HLA antibodies were first defined as donor-specific or non-donor specific (DSA or non-DSA), and subsequently as complement-binding /or non-complement-binding (DSA and non-DSA). DSA were present in 27 (21%) and non-DSA in 30 (25%) patients. 19 patients had pretransplant DSA, while 8 recipients produced *de novo* DSA during the first year after transplantation (Table 2). In the second part of our study, as indicated above, we compared two different techniques for detecting complement-binding antibodies, i.e. the C1q Screen and Lifecodes C3d detection tests. With exception of one recipient, who produced *de novo* complement-fixing non-DSA, all C3d-positive patients were also positive in the C1q test (Table 3). C1q-positive DSA were detected in 7 (5.7%) patients and complement-binding non-DSA in 7 (5.7%) recipients (Table 3). Complement-binding DSA (both C1q and C3d positive) had MFI values >9000 in the SA bead test (MFI HLA-B = 17483, HLA-DQ = 16182). Complement-fixing non-DSA had MFI >6000 (HLA A = 11224, HLA B = 9549 and HLA DQ = 7541). As far as clinical outcome, there were totally 28 antibody mediated rejections, 21 cellular rejections (CR), 8 concurrent AMR and CR and in 28 patients the lack of rejection against the graft was biopsy-proven. There were also 9 patients where post-transplant complications that were not caused by rejection (graft dysfunction, recurrence of hepatitis C). The incidence of rejection in patients with complement-binding and non-complement-binding DSA is shown in Fig. 1. All three patients with pretransplant complement-binding DSA developed severe antibody-mediated rejection, furthermore, two grafts in this cohort failed due to immunological reasons (Fig 1.). Three patients out of four, who produced *de novo* complement-fixing DSA, had AMR (two mild form and one plasma-rich rejection). In the non-complement-fixing cohort (21 patients), there were 6 episodes of AMR – five in patients with preformed antibodies and one in a patient with *de*

novo produced antibodies. Our study had a certain limitation – 29 patients did not have graft biopsy, due to the technical complexity of the procedure.

In conclusion, analysis of alloantibodies by the single antigen bead technique and their definition with respect to complement-fixing activity may provide clinically relevant information about the risk of antibody-mediated rejection after liver transplantation.

## Acknowledgements

Supported by the Ministry of Health of the Czech Republic, Grant nr. 16-27477A.

## References

1. Hübscher SG. Antibody-mediated rejection in the liver allograft. *Curr Opin Organ Transplant*. 2012; 17:280-6.
2. Cheng EY. The Role of Humoral Alloreactivity in Liver Transplantation: Lessons Learned and New Perspectives. *J Immunol Res*. 2017; 2017:3234906. doi: 10.1155/2017/3234906.
3. Hogen R, DiNordia J, Dhanireddy K. Antibody-mediated rejection: what is the clinical relevance? *Curr Opin Organ Transplant*. 2017; 22: 97-104
4. Demetris AJ, Bellamy C, Hübscher SG, O'Leary J, Randhawa PS, Feng S et al. 2016 Comprehensive Update of the Banff Working Group on Liver Allograft Pathology: Introduction of Antibody-Mediated Rejection. *Am J Transplant*. 2016; 16: 2816-2835
5. Demetris AJ, Bellamy CO, Gandhi CR, Prost S, Nakanuma Y, Stolz DB. Functional Immune Anatomy of the Liver-As an Allograft. *Am J Transplant*. 2016; 16:1653-80
6. Musat AI, Agni RM, Wai PY, Pirsch JD, Lorentzen DF, Powell A, et al. The significance of donor-specific HLA antibodies in rejection and ductopenia development in ABO compatible liver transplantation. *Am J Transplant*. 2011; 11:500-10
7. O'Leary JG, Kaneku H, Jennings LW, Bañuelos N, Susskind BM, Terasaki PI et al. Preformed class II donor-specific antibodies are associated with an increased risk of early rejection after liver transplantation. *Liver Transpl*. 2013; 19:973-80
8. Kaneku H, O'Leary JG, Banuelos N, Jennings LW, Susskind BM, Klintmalm GB, et al. De novo donor-specific HLA antibodies decrease patient and graft survival in liver transplant recipients. *Am J Transplant*. 2013; 13: 1541-8.

9. O'Leary JG, Demetris AJ, Friedman LS, Gebel HM, Halloran PF, Kirk AD, et al. The role of donor-specific HLA alloantibodies in liver transplantation. *Am J Transplant.* 2014; 14: 779-87
10. Del Bello A, Congy-Jolivet N, Danjoux M, Muscari F, Kamar N. Donor-specific antibodies and liver transplantation. *Hum Immunol.* 2016; 77: 1063-1070.
11. Ducreux S, Guillaud O, Bosch A, Thaumat O, Morelon E, Hervieu V, et al. Monitoring efficiency of humoral rejection episode therapy in liver transplantation: any role for complement binding Luminex Single Antigen assays? *Transpl Immunol.* 2016; 35: 23-8.

Table 1: Demographic characteristics in patients with biopsy-proven rejection and without rejection.

	AMR <sup>1</sup> (n=28)	CR <sup>2</sup> (n=21)	AMR + CR (n=8)	Biopsy-proven absence of rejection (n=28)
Age (years)	61.5 (15 – 73)	58 (38 – 71)	58 (40 – 73)	50.5 (6 – 69)
PRA <sup>3</sup> (>10%)	16 (57%)	18 (85%)	4 (50%)	19 (68%)
PRA (≤10%)	5 (18%)	2 (10%)	2 (25%)	4 (14%)
PRA (>50%)	1 (4%)	1 (5%)	2 (25%)	0 (0%)
PRA (10-50%)	2 (7%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (7%)
HLA mismatches	5 (3 – 6)	5 (4 – 6)	5 (4 – 6)	5 (2 – 6)

<sup>1</sup> AMR – antibody-mediated rejection

<sup>2</sup> CR – cellular rejection

<sup>3</sup> Panel-reactive antibodies (PRA) before transplantation were defined by the complement-dependent cytotoxicity test.



Table 2. Analysis of HLA antibodies - DSA-positive, DSA-negative, preformed and *de novo* antibody positive patients.

Patients (n) 123	
DSA-positive	27 (21%)
- Pre-formed	19 (15%)
- De novo	8 (6%)
Non-DSA positive	30 (25%)
- Pre-formed	17 (14%)
- De novo	13 (11%)
Negative	66 (54%)

Table 3. Complement-binding vs. non-complement binding antibodies, comparison of the C1q and C3d techniques.

Patients (n)		Patients (n)	
C1q DSA-positive	7 (5.7%)	C3d DSA-positive	5 (4.1%)
- Preformed	3 (2.4%)	- Preformed	3 (2.4%)
- De novo	4 (3.3%)	- De novo	2 (1.6%)
C1q non-DSA-positive	7 (5.7%)	C3d non-DSA-positive	4 (3.3%)
- Preformed	4 (3.3%)	- Preformed	3 (2.4%)
- De novo	3 (2.4%)	- De novo	1 (0.8%)
C1q-negative	109 (88.6%)	C3d-negative	114 (92.7%)

Fig. 1. Complement-binding, non-complement-binding DSA and incidence of rejection.

